



<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/47, A01K 67/027, A61K 38/17, 39/395, 48/00, C07K 16/18, C12N 1/21, 5/10, 15/63, C12P 21/02, 21/08, G01N 33/48 // (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:91)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/15628</p> <p>(43) 国際公開日 1998年4月16日(16.04.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03549</p> <p>(22) 国際出願日 1997年10月3日(03.10.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/287636 1996年10月9日(09.10.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友製薬株式会社(SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 木村 徹(KIMURA, Toru)[JP/JP] 〒525 滋賀県草津市野路町1402 Shiga, (JP) 菊地 薫(KIKUCHI, Kaoru)[JP/JP] 〒665 兵庫県宝塚市南ひばりガ丘2-11-15-909 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 青山 蓑, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NOVEL SEMAPHORIN GENE: SEMAPHORIN W</p> <p>(54)発明の名称 新規セマフォリン遺伝子: セマフォリンW</p> <p>(57) Abstract Semaphorin W having an inhibitory effect on nerve extension and its gene; other semaphorins hybridizable with the semaphorin W gene; modified proteins and partial peptides of the semaphorin W; an antibody against the semaphorin W; an antisense nucleotide of the semaphorin W gene; the use of these substances as medicines, diagnostic drugs or research reagents; a method for screening semaphorin W antagonists with the use of the semaphorin W; semaphorin W antagonists obtained by this screening method; medicines containing these antagonists; and transgenic animals, etc. relative to the semaphorin W.</p>		

(57) 要約

神経の伸長に対し抑制的に作用するセマフォリンW及びその遺伝子、該セマフォリンW遺伝子にハイブリダイズする他のセマフォリン、該セマフォリンWの改変タンパク質、部分ペプチド、抗体、該セマフォリンW遺伝子のアンチセンスヌクレオチド、これらの物質の医薬・診断薬あるいは研究用試薬としての用途、該セマフォリンWを用いたセマフォリンWアンタゴニストのスクリーニング方法、該スクリーニング方法により得られるセマフォリンWアンタゴニスト、これらアンタゴニストを含有する医薬、該セマフォリンWについてのトランスジェニック動物等を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロベニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニアビサウ	MK	マケドニア田ユーゴスラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	US	米国
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	YW	ユーゴスラビア
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
EE	エストニア						

明 細 書

新規セマフォリン遺伝子：セマフォリンW

発明の属する技術分野

本発明は、セマフォリンファミリーに属する新規なセマフォリンである、セマフォリンWおよび該セマフォリンWの医薬・診断薬あるいは研究用試薬への用途に関する。さらに詳しくは、神経の伸長に対して抑制的に作用するセマフォリンW及びその遺伝子、または該セマフォリンW遺伝子にハイブリダイズする他のセマフォリン、該セマフォリンWの改変タンパク質、部分ペプチド、抗体、該セマフォリンW遺伝子のアンチセンスヌクレオチド、該セマフォリンWのアンタゴニスト、トランスジェニック動物、或いはこれらの物質の医薬・診断薬あるいは研究用試薬としての用途に関する。

従来の技術

ヒトなど高等生物では中枢神経は一度傷害を受けると再生する能力がないことが広く知られている。このため交通事故などで脊髄の損傷を受けた人は、半生を半身不随として過ごさなければならない。一方、末梢神経はこれらの高等生物においても旺盛な再生能が保持されており、手足の神経は一度切断されても徐々に再生し、それに伴って機能も回復することが知られている。

1980年代初期にAguayoらのグループは、損傷を与えた高等生物の中枢神経中に実験的に末梢神経を移植することにより中枢神経の軸索伸長が誘導されることを見出し、それまで再生能力はないと一般に考えられていた高等生物の中枢神経が、周囲の環境さえ整えば軸索を再生することを明らかにした (Nature, 284, 264-265(1980)、Science, 214, 931-933(1981))。

この報告は、高等生物の中枢神経系には「中枢神経再生阻止因子」とでも呼べるような因子が存在しており、この因子が中枢神経の再生を抑制している可能性、そしてその抑制を解除することにより中枢神経が再生する可能性を示唆しており、中枢神経再生治療への道を開いた。

1988年にSchwabらのグループは、中枢神経系のミエリン由来のタンパク質の中に、上記中枢神経再生阻止因子が存在していることを明らかにした。そして、該中枢神経再生阻止活性を有するタンパク質を部分的ながら精製することに成功し、このタンパク質画分をNI35/250と名付けた(Annu. Rev. Neurosci., 16, 565-595(1993))。しかし、その単離・同定及び遺伝子クローニングは未だに成功していない。また、彼らは粗精製した NI35/250 を動物に免疫し、中和活性を有する抗体(IN-1)を取得することにも成功している。この抗体はウェスタンブロットで NI35/250 のバンドを認識し、免疫染色で NI35/250 が分布していると考えられる部位を染めることができる。そして、実験的に脊髄を損傷させた動物にこの抗体を投与すると、2-3週間後には脊髄の神経が部分的ながら再生すること、更に2-3か月後には機能も回復することを明らかにしている(Nature, 343, 269-272(1990)、Nature, 378, 498-501(1995))。これは、まさに前記 Aguayoらにより示唆された中枢神経再生阻止因子の存在、及び該因子の活性を阻止することによる中枢神経の再生を実験的に証明したものであり、その価値は大きい。しかし該抗体はヒト型ではなくラット型NI35/250に対する抗体であり、また安定性、特異性も低い。また上述のように該抗体の投与により再生が認められたものの、その効果は部分的かつ不完全であり、全ての運動機能が回復したわけではない。従ってこれら問題点の解決策として、NI35/250あるいはこれに類似の中枢神経再生阻止因子の遺伝子の実体を明らかにし、分子生物、神経科学等の知見に基づいて、中枢神経再生阻止活性を

より効果的に阻害するアンタゴニストを開発すること、あるいは該再生阻止因子の遺伝子の発現抑制方法を開発することが不可欠であると考えられる。

ところで中枢・末梢を問わず神経系がその主な機能である情報伝達・処理を正確に行うためには、発生段階、すなわち胚あるいは胎児の過程において、神経細胞間あるいは神経細胞と末梢の受容器・効果器との間に複雑な神経ネットワークを形成しなければならない。神経ネットワーク形成のためには、伸長する神経突起を遠く離れた標的部位に正確に導く（ガイドする）巧みな機構が必要である。

これまでは、神経ネットワークの形成には突起伸長促進因子・突起誘引因子と言った神経の突起伸長を正に制御する因子が主な役割を果たしているものと考えられてきた。しかしそれとは逆の、つまり伸長阻止活性を持った負の因子が正確なガイダンスには重要であることが、ネットワーク形成メカニズムに関する最近の研究から明らかになりつつある（Cell, 78, 353-356(1994)）。

このような伸長阻止活性を有する因子の代表が、「セマフォリン」と呼ばれるタンパク質である。最初に発見されたセマフォリンはバッタから発見されたファシクリンIVであり、その後、ニワトリからコラブシン（後にコラブシンIと命名）が発見され（Cell, 75, 217-227(1993); Neuron, 9, 831-845(1992)）、ショウジョウバエ、カブトと言った昆虫からヒトまたはウイルスにまで広く、10以上のセマフォリンファミリーに属する遺伝子が報告されている（Cell, 81, 471-474(1995)）。これらのセマフォリンは、そのアミノ酸配列上にセマフォリンドメインと呼ばれるおよそ 500アミノ酸からなる類似の構造を有するのが特徴である（Neuron, 14, 941-948(1995)、Cell, 75, 1389-1399(1993)）。しかし、セマフォリン遺伝子相互の

間でセマフォリンドメインのアミノ酸一次配列上の類似性は80%-20%であり、必ずしも高くはない。

これらのセマフォリンの中で機能が確認されているものはバットのファシクリン IV、ショウジョウバエのセマフォリンI, II、ニワトリのコラプシン、そしてほ乳類におけるコラプシンであるセマフォリンIII などごく一部であり、これらは全て神経突起の伸長、シナプス形成に対して抑制的に作用することが知られている。中でもセマフォリンIII は、*in vitro* において培養神経の成長円錐を短時間に退縮させる活性（成長円錐退縮活性）をも有することが報告されている（Neuron, 14, 941-948(1995)、Neuron, 14, 949-959(1995)、Cell, 81, 631-639(1995)、Cell, 75, 1389-1399(1993)、Cell, 75, 217-227(1993)、Neuron, 9, 831-845(1992)）。

以上のように既知のセマフォリンは、発生段階において成長円錐退縮活性及び神経突起の伸長抑制活性を有し、神経の正確なガイダンスを行う役割を担っていることが明らかになりつつあるが、これらのセマフォリンが発生段階のみならず、成体においても何らかの機能を有しているのか否かは現在のところ明らかにされていない。ましてやセマフォリンが、成体における中枢神経の再生阻止因子としての役割を担っているか否かは全く不明である。勿論、既知のセマフォリンについて、神経突起伸長を抑制する負のガイダンス因子であることが明らかにされているため、該セマフォリンを中枢神経の再生阻止因子の候補として挙げることもできなくはない

（Nature, 378, 439-440(1995)）。しかし、高等生物で唯一機能解析がなされているセマフォリンIII（Sema III）は、末梢神経である感覚神経あるいは交感神経に対しては突起伸長阻止活性を示すが、中枢神経である網膜神経に対しては作用しないことが *in vitro* の実験結果により明らかにされている（Cell, 75, 217-227(1993)）。加えて、本発明者らがSemaIIIの成

体における発現分布をノーザン解析により調べた結果、主に末梢組織で発現していることが判明している（後述の参考例2参照）。従ってこのような Sema IIIが、中枢神経再生阻止因子としての機能を有しているとは考え難い状況にある。

発明が解決しようとする課題

本発明が解決しようとする課題は、セマフォリンファミリーに属する新規なセマフォリンである、セマフォリンW及びその遺伝子を提供することにより、神経疾患に関わる医薬、中でも中枢神経の再生に関わる医薬、又は診断薬あるいは研究用試薬を提供することにある。さらに詳しくは、神経の伸長に対し抑制的に作用するセマフォリンW及びその遺伝子、または該セマフォリンW遺伝子にハイブリダイズする他のセマフォリン、該セマフォリンWの改変タンパク質、部分ペプチド、抗体、該セマフォリンW遺伝子のアンチセンスヌクレオチド、或いはこれらの物質の医薬・診断薬あるいは研究用試薬としての用途、さらには該セマフォリンWを用いたセマフォリンWアンタゴニストのスクリーニング方法、該スクリーニング方法により得られるセマフォリンWアンタゴニスト、これらアンタゴニストを含有する医薬、若しくは該セマフォリンWについてのトランスジェニック動物等をも提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

本発明者らは、神経疾患に関わる医薬、中でも中枢神経の再生に関わる医薬、又は診断薬あるいは研究用試薬の提供のために、未だクローニングされていない新規なセマフォリンを同定することを考えた。具体的には、前述のNI35/250と負のガイダンス因子であるセマフォリンとのin vitro活性の類似性、すなわちNI35/250はin vitroで成長円錐退縮活性及び神経の突起伸長抑制活性を有しているのに対し(J. Neurosci., 8, 2381-2393(198

8)、Science, 259, 80 (1993))、既知のセマフォリンも突起伸長抑制活性を有しており、中でもセマフォリンIII は成長円錐退縮活性も有しているという点に着目し、未だ同定されていない未知のセマフォリンの中に、中枢神経の再生を阻止するものが存在している可能性を考えた。すなわち、1)成体の中枢神経系で強く発現しており、2)神経の再生(伸長)が抑制されていない成体の末梢組織や胎児等ではあまり発現していない、といった特徴を有するセマフォリンは未だ知られていないが、そのような特徴を有する未知のセマフォリンを同定することができれば、該セマフォリンは中枢神経の再生阻止に関与しているのではないかと考えた。

そこでまず、これまで報告されているセマフォリン遺伝子相互の間で比較的よく保存されているアミノ酸をコードするDNA配列を、EST

(Expressed Sequence Tags)データベースにより検索したところ、セマフォリン間で非常に良く保存されている7個のアミノ酸からなる配列(Gln(またはArg)-Asp-Pro-Tyr-Cys-Ala(またはGly)-Trp)と非常に似た配列であるGln-Asp-Pro-Val-Cys-Ala-Trpを一部配列としてコードするDNA断片配列、T09073を見い出した。

このT09073の配列情報は僅か364bpと短く、また解読されていない塩基が存在しており、さらにはオープンリーディングフレームを決定することもできなかったため、このT09073が「セマフォリン」をコードする遺伝子の一部に該当するとは、この段階では到底結論できない状況にあった。さらにこのT09073は、ヒト小児脳のcDNAライブラリー由来の配列としてデータベースに登録されたものであるが、胎児や成体の末梢組織で発現しているかどうかは不明であり、中枢神経系に特異的に発現する新規なセマフォリン遺伝子の一部に該当するものとは結論することができなかった。

そこでまず、このT09073を有する遺伝子の発現分布を見るために、T090

73の 5' 側196塩基対よりなるDNA断片をプローブに用いてノーザン解析を行った。その結果、このT09073の対応遺伝子は成体の中枢神経組織では強く、また広く発現しているが、それ以外では胎児期、生後を通じて成体の肺および脾臓でのみ発現していることが見出されたため、まさに本発明者らが意図した新規セマフォリン遺伝子としての期待される発現分布を示すことが明らかとなった。

そこで次に、このT09073を有する遺伝子の全長をクローニングして新規セマフォリンであるか否かを判断することとした。すなわち、上記196塩基対よりなるDNA断片をプローブとしてラットcDNAライブラリーをスクリーニングした結果、クローニングされた遺伝子はセマフォリンに特有の配列を有する新規セマフォリン遺伝子であることが判明した。我々は、この新規セマフォリンを「セマフォリンW」と命名した。

さらに解析を続けた結果、該セマフォリンWは神経の伸長に対する抑制活性、中でも中枢神経に対する抑制活性という、本発明者らが意図した新規セマフォリン遺伝子としての作用を有することが見出された。

以上のように本発明のセマフォリンWは成体の中枢神経系で強く発現し、また中枢神経に対して抑制的に作用することから、成体において中枢神経の再生阻止に関与していると考えられる。該セマフォリンWを用いてセマフォリンWのアンタゴニストをスクリーニングすることが可能であり、そのようなスクリーニング系により見出されたアンタゴニストは、中枢神経の再生を促進することが考えられる。またセマフォリンW遺伝子のアンチセンスDNAあるいはRNAも、前記アンタゴニストと同様に中枢神経の再生を促進することが考えられる。

さらに本発明のセマフォリンWは、末梢神経に対する抑制作用も有していることから、末梢組織に対して適用された場合には、末梢神経の伸長を

抑制することによりアトピー性皮膚炎等の免疫疾患及び疼痛等の治療薬、あるいは診断薬となることも考えられる。また該セマフォリンWは、セマフォリンファミリーに属する新規なセマフォリンであり、かつその発現分布及び作用は前記したように従来にない特徴的なものである。従って該セマフォリンWは、当該分野における重要な研究材料、研究試薬となる。

本発明は、これらの研究成果に基づいて完成するに至ったものである。

即ち本発明の要旨は、

- (1) 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子、
 - (a) 配列番号：3 に記載のアミノ酸配列からなるセマフォリンWタンパク質
 - (b) 配列番号：3 に記載のアミノ酸配列において1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経の伸長に対して抑制的に作用するタンパク質。
- (2) 以下の (c) 、(d) 又は (e) のDNA からなる遺伝子、
 - (c) 配列番号：1 又は配列番号：2 に記載の塩基配列からなるセマフォリンWDNA
 - (d) 配列番号：1 又は配列番号：2 に記載の塩基配列からなるDNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ神経の伸長に対して抑制的に作用するタンパク質をコードするDNA
 - (e) 前記 (d) に記載のDNA であって、かつ配列番号：4 又は配列番号：5 に記載の塩基配列、及び／又は配列番号：10 に記載の塩基配列を含有するDNA。
- (3) 配列番号：7 に記載の塩基配列からなるDNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセマフォリンドメインを有するタンパク質をコードするDNA からなる遺伝子、

(4) 前記(1)～(3)のいずれか記載の遺伝子を発現することによって得られるタンパク質、

(5) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経の伸長に対して促進的に作用するタンパク質をコードする遺伝子、

(6) 前記(5)記載の遺伝子を発現することによって得られるタンパク質、

(7) ヒトcDNAライブラリー又はヒトゲノムライブラリーからクローニングされるDNAであって、配列番号：1、配列番号：4又は配列番号：10に記載の塩基配列からなるDNAの少なくとも一部からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、

(8) 前記(1)～(3)又は前記(5)記載の遺伝子、あるいは前記(7)記載のDNAのいずれかを発現する発現プラスミド、

(9) 前記(8)記載の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体、

(10) 前記(9)記載の形質転換体を培養し、発現される組換えタンパク質を回収することからなる、組換えタンパク質の生産方法、

(11) 前記(4)又は(6)記載のタンパク質の、少なくとも6アミノ酸以上の部分よりなるペプチド、

(12) 神経の伸長に対して促進的に作用する、前記(11)記載のペプチド、

(13) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第204位のグルタミン酸、あるいは該グルタミン酸の位置に相当するアミノ酸を含有することを特徴とする、前記(11)記載のペプチド、

(14) 前記(1)～(3)のいずれか記載の遺伝子、あるいは前記(7)

記載のDNAの、少なくとも8塩基以上の部分に対応するアンチセンスヌクレオチド、あるいはその化学的修飾体、

(15) 前記(4)記載のタンパク質の発現を抑制することを特徴とする、前記(14)記載のアンチセンスヌクレオチド、あるいはその化学的修飾体、

(16) 前記(4)又は(6)記載のタンパク質、あるいは前記(11)～(13)いずれか記載のペプチドに対する抗体、

(17) 前記(1)～(3)又は前記(5)記載の遺伝子、前記(7)記載のDNA、前記(4)又は(6)記載のタンパク質、前記(11)～(13)記載のペプチド、前記(14)又は(15)記載のアンチセンスヌクレオチド又はその化学的修飾体、あるいは前記(16)記載の抗体の、いずれかを有効成分として含有する医薬、

(18) 前記(4)記載のタンパク質を用いることを特徴とする、セマフォリンWアンタゴニストのスクリーニング方法、

(19) 前記(18)記載のスクリーニング方法を用いて得られる、セマフォリンWアンタゴニスト、

(20) 前記(6)記載のタンパク質、前記(11)～(13)いずれか記載のペプチド、又は前記(16)記載の抗体よりなる、前記(19)記載のセマフォリンWアンタゴニスト、

(21) 前記(14)又は(15)記載のアンチセンスヌクレオチドあるいはその化学的修飾体、前記(19)又は(20)記載のセマフォリンWアンタゴニストの、少なくとも一つを含有することを特徴とする、中枢神経の再生促進剤、

(22) 前記(4)記載のタンパク質の少なくとも一つを含有することを特徴とする、末梢神経の伸長抑制剤、並びに

(23) 前記(1)～(3)又は前記(5)記載の遺伝子、あるいは前記(7)記載のDNAのいずれかを人為的に染色体中に挿入したか、あるいはいずれかをノックアウトさせたトランスジェニック動物、に関する。

発明の実施の形態

本発明の第1の態様は、(a) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列からなるセマフォリンWタンパク質をコードする遺伝子、あるいは(b) 前記配列番号：3に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経の伸長に対して抑制的に作用するタンパク質をコードする遺伝子である。また本発明の第2の態様は、(c) 配列番号：1又は配列番号：2に記載の塩基配列からなるセマフォリンWDNAからなる遺伝子、又は(d) 前記配列番号：1又は配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ神経の伸長に対して抑制的に作用するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子、あるいは(e) 前記(d)のDNAのうち、配列番号：4又は配列番号：5に記載の塩基配列、及び／又は配列番号：10に記載の塩基配列を含有するDNAからなる遺伝子である。以下、これらの遺伝子につき順次説明する。

1) セマフォリンWをコードする遺伝子(セマフォリンW遺伝子)

上記遺伝子のうち、「配列番号：3に記載のアミノ酸配列からなるセマフォリンWタンパク質をコードする遺伝子」、又は「配列番号：1又は配列番号：2に記載の塩基配列からなるセマフォリンWDNAからなる遺伝子」とは、ラットセマフォリンWをコードする遺伝子である。このうち配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAは、配列番号：1に記載のラットセマフォリンW遺伝子のオープンリーディングフレームに相当するものである。これらの遺伝子は、例えば実施例3に記載したように、ESTデ

ータベースから発見された「T09073」の配列を元に作製したプローブ（例えば配列番号：7に記載の塩基配列を有するDNAプローブ）を用いてラットの中樞神経系の組織由来のcDNAライブラリーあるいはゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、クローニングすることができる。これらクローニングの個々の技術は、例えば Molecular Cloning 2nd Edt. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))等の基本書を参照することにより行うことができる。クローニングされたDNAの塩基配列の決定も、市販のシーケンスキット等を用いる通常の方法により行うことができる。

なお上記クローニング法によらなくとも、本発明のラットセマフォリンW cDNAの塩基配列の公開に伴い、当業者ならば、該cDNAの一部をプローブあるいはPCRプライマーに用いてラットセマフォリンWをコードする遺伝子を容易にクローニングすることができる。

2) セマフォリンWの改変タンパク質をコードする遺伝子

前記遺伝子のうち、「配列番号：3に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経の伸長に対して抑制的に作用するタンパク質をコードする遺伝子」とは、いわゆるセマフォリンWの「改変タンパク質」のうち、神経の伸長に対して抑制的に作用するタンパク質をコードする遺伝子を指す。該タンパク質をコードする遺伝子は、例えば部位特異的突然変異誘発 (Methods in Enzymology, 100, 448- (1983))やPCR法 (Molecular Cloning 2nd Edt. 15 章, Cold Harbor Laboratory Press (1989)、"PCR A Practical Approach" IRL Press 200-210(1991))により、当業者ならば容易に得ることができる。なおここで、欠失、置換及び／又は付加されるアミノ酸残基の数は、上記部位特異的変異誘発等の周知の方法により欠失、

置換及び／又は付加できる程度の数を目指す。

ここで、「神経の伸長に対して抑制的に作用する」とは、例えば神経の成長円錐に対する退縮活性を有すること、あるいは神経の伸長阻害活性を有することを指す。該活性は、セマフォリンWあるいはその改変タンパク質をコードするDNAの発現産物等の被験物質を用い、例えば以下のようにして測定することができる。

セマフォリンWは膜タンパク質であるため、セマフォリンW遺伝子で形質転換された細胞の細胞膜にセマフォリンWは存在している。従って形質転換された細胞の膜画分を材料に使うことで、前記被験物質の活性を容易に測定できる。

活性測定法としては、前記したように神経の成長円錐に対する退縮活性 (M. Igarashi et al Science vol. 259 pp77-79(1993))、あるいは神経の伸長阻止活性 (J. A. Davies et. al. Neuron vol. 2 pp11-20(1990)やM. Bastmeyer J. Neurosci. vol. 11 pp626-640(1991)など) などがある。成長円錐退縮活性の測定方法は文献 (M. Igarashi et al Science vol. 259 pp77-79(1993)) に詳しく述べられているが、簡単には、セマフォリンW等の被験物質を発現する細胞をホモゲナイズし、細胞膜の画分を含むホモジェネートを用いる方法、あるいは精製した膜画分を用いる方法 (E. C. Cox et. al. Neuron vol. 2 pp31-37(1990))、あるいは膜画分から抽出した蛋白質を用いる方法 (Neuron vol. 2 pp21-29(1990)、あるいはその蛋白質をリポソームに再構成したものを材料にする方法 (C. E. Bandtlow Science vol. 259 pp80-84(1993))、あるいは細胞膜に結合しないように改変した可溶化タンパク質を用いる方法 (Neuron vol. 18 pp383-396(1997)) などが可能である。これらを材料にして実際に成長円錐の退縮活性を測定するには、ラミニンやコラーゲン、ポリリジン、ポリオルニチンといったような神経突

起の伸長と成長円錐の形成を促進する物質をコーティングした容器の中で通常の条件で培養した神経細胞(Bankerらの編纂によるCulturing Nerve Cells MIT Press(1991)など)に対し、先に述べたような形状のセマフォリンW等の被験物質を添加することによって行う。添加後、成長円錐の退縮が起こるのに十分な時間(通常添加後30分から1時間)が経過した時点でこの神経細胞を1%グルタルアルデヒドなどで固定し、顕微鏡下で退縮を起こした成長円錐の数を計数する。このときセマフォリンW等の被験物質を発現していない細胞を出発材料にして、被験物質発現細胞を用いたときと全く同様にして調整した試料を対照として観察することが重要である。通常、試料の平均化は試料内に含まれる総蛋白量によって行う。一方、突起伸長阻害活性を測定するには上記と同様にして調整したセマフォリンW等の被験物質をマイクロポアフィルターやガラスやプラスチック製の培養容器の表面の一部分にコーティングし、通常の条件で培養した神経細胞が、このコーティング面上では接着できないこと、突起の伸長速度が非常に低下すること、あるいはコーティング面の外からコーティング面に向かって伸長する神経突起がコーティング面との境界に達しても、停止したり、回避したりして面内に侵入できないことなどを指標とする。さらにこの変法として、2種の被験物を交互にしま状にコーティングするストライプアッセイ(Development 101, 685-696(1987))を用いることにより、神経突起伸長抑制活性を測定することもできる。コラーゲンゲル中で被験物質を発現する細胞の塊と神経細胞とを同時に培養した場合には、伸長する神経突起が被験物質発現細胞の塊の中に侵入できないことも指標とできる(A. Sophia et. al. Cell vol.81 pp621-629(1995))。

また上記活性測定用の細胞としては、中枢神経系及び末梢神経系のいずれの細胞をも用いることができる。なお「従来の技術」の項に述べたよう

に、哺乳類の成体の中枢神経系には元々再生（伸長）阻止因子が大量に存在しているため、in vivoで中枢神経の伸長に対する抑制作用を測定することは非常に困難であり、通常、上記のようなin vitroの方法を用いて測定を行う。これらはin vitroの方法であるため各々に特徴があり、従って複数の方法を用いて活性を確認することが好ましい。また、該作用の測定に用いる神経細胞は脊髄や大脳皮質運動野の運動神経、網膜神経節細胞などの中枢神経が好ましいが、中枢神経再生阻止因子として知られている N I35/250 が、末梢神経である上頸神経節や後根神経節の神経細胞に対しても突起伸長阻止や成長円錐退縮などの活性を有することが判明しているため(J. Cell Biol., 106, 1281-1288(1988)、Science, 259, 80-83(1993))、該末梢神経を用いることも可能である。

本態様の改変タンパク質の具体例としては、例えばヒト型あるいはラット型セマフォリンWの改変タンパク質が挙げられ、より具体的には以下のような改変タンパク質が挙げられる。

既知のセマフォリンの構造を比較すると、保存されたアミノ酸は大部分セマフォリンドメイン内に位置し、セマフォリンの活性発現にはこれら保存されたアミノ酸が重要であると考えられる。さらに、本発明者らがSema IIIのセマフォリンドメイン内の第198位のアスパラギン酸がグリシンに置換されたタンパク質の成長円錐退縮活性を測定したところ、該タンパク質は活性を有していなかった（後述の参考例1参照）。従ってSema IIIにおいては、第198位のアスパラギン酸が活性発現に重要であると考えられる。既知のセマフォリンにおけるこの位置に相当するアミノ酸を比較すると、該アミノ酸は非常に良く保存されていることが明らかとなり、一部のセマフォリンにおいてグルタミン酸である以外は全てアスパラギン酸であった。従って、Sema III以外のセマフォリンにおいても、この位置の

アミノ酸が活性発現に重要であると考えられる。本発明のセマフォリンWにおいてSema IIIの第198位に相当するアミノ酸は、配列番号：3に記載のアミノ酸配列中、第204位のグルタミン酸であると予想され、また後述する配列番号：6に記載のヒトセマフォリンWのアミノ酸配列においては第16位のグルタミン酸であると予想される。

以上の知見より、セマフォリンWの有する活性を、その改変タンパク質においても残存させるためには、上記アミノ酸の欠失、置換及び／又は付加は、セマフォリン間で保存されたアミノ酸以外の部分で行うことが望ましい。特に、配列番号：3のラットセマフォリンWの第204位のグルタミン酸、あるいは配列番号：6のヒトセマフォリンWの第16位のグルタミン酸は、改変しないことが望ましい。一方セマフォリン間で保存されたアミノ酸を置換しかつセマフォリンWの活性を残存させる場合は、類似の側鎖を有するアミノ酸に置換することが望ましい。このように保存されたアミノ酸を類似の側鎖を有するアミノ酸に置換することによって、セマフォリンWの有する活性をさらに増強させた改変タンパク質を作製することが可能である。このような活性の増強した改変タンパク質は、後述の本発明の第22態様の項に記載の如き末梢神経の伸長抑制剤として非常に好適である。

なお、本態様において「保存されたアミノ酸」とは、Cell, 75, 1389-1399(1993)の図2、もしくはNeuron, 14, 941-948(1995)の図1において、50%以上のセマフォリン遺伝子においてアミノ酸が同一となるような位置に存在するアミノ酸を言う。

3) セマフォリンW遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

前記DNAのうち、「配列番号：1又は配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ神経の伸長に対して抑制的に作用するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子」とは、すなわちヒト、マウス等の哺乳動物由来の全てのセマフォリンW遺伝子のような、配列番号：1又は配列番号：2に記載の塩基配列からなるラットセマフォリンW遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子を指す。

ここで「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子」とは、例えばホルムアミド濃度：45%(v/v)、塩濃度：5 × SSPE、温度：42℃程度の条件下でハイブリダイズさせ、塩濃度：2 × SSPE、温度：42℃程度の条件下で洗浄した場合において、前記ラットセマフォリンW遺伝子とハイブリダイズするような遺伝子を指す。これら遺伝子の具体的なクローニングは、たとえば配列番号：1に記載のDNAの一部又は全部をプローブに用いて各種動物の組織から調製したcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより行うことができる。ここでcDNAライブラリーとしては、例えばヒトの中樞神経系の組織由来のmRNAより調製したcDNAライブラリーが挙げられる。具体的なスクリーニングは、例えばMolecular Cloning 2nd Edt. (Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))等の基本書を参照することにより行うことができる。

このような本態様の遺伝子としては、哺乳類及び鳥類のセマフォリンW遺伝子が挙げられる。哺乳動物間あるいは哺乳類と鳥類の間では相同な遺伝子なら配列は非常に似ており、通常80%以上、多くは90%以上の塩基配列が共通である。従って該哺乳類、鳥類の全てのセマフォリンW遺伝子は、本態様の遺伝子に該当する。換言すれば、80%以上のホモロジー

を有するものが本態様の遺伝子であり、好ましくは、90%以上のホモロジーを有するものが挙げられる。

本態様の遺伝子としてより具体的には、例えば配列番号：4又は配列番号：5に記載の塩基配列、及び／又は配列番号：10に記載の塩基配列を含有するヒト型のセマフォリンW遺伝子が挙げられる。ここで配列番号：4及び配列番号：5に記載の塩基配列は、ヒト型セマフォリンWのC末側の587アミノ酸（配列番号：6）をコードするDNAであって、配列番号：5に記載の塩基配列は配列番号：4に記載の塩基配列のオープンリーディングフレームに相当するものである。また配列番号：10に記載の塩基配列は、ヒト型セマフォリンWのN末側の111アミノ酸（配列番号：11）をコードするDNAである。これらヒト型セマフォリンWのDNAのクローニングは、上述のスクリーニング法その他、例えば配列番号：1に記載されたラットセマフォリンWの塩基配列を基にプライマーを合成し、ヒトの中枢神経系の組織由来のmRNAより調製したcDNAを鋳型にしてPCR反応を行うことにより（McPhersonらの編纂によるPCR(1991) IRL Press等を参照）行うことができる。またESTクローン（米国ジェノムシステムズ社製）を用いてクローニングすることもできる。

前記したように「配列番号：4又は配列番号：5に記載の塩基配列」、「配列番号：10に記載の塩基配列」は、それぞれヒトセマフォリンWの部分的な塩基配列である。しかし当業者にとっては上記と同様の方法により、該塩基配列の一部又は全部よりなるDNAをプローブにしてヒトcDNA又はヒトゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、あるいはPCR法を用いることによって、容易にヒトセマフォリンW遺伝子の全長をクローニングし、塩基配列を決定することができる。従って本態様の遺伝子の具体例として、このヒトセマフォリンW遺伝子の全長が挙げ

られる。

本発明の第3の態様は、配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセマフォリンドメインを有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子である。

ここで「配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNA」とは、セマフォリン間でよく保存された7アミノ酸からなる配列（Gln(またはArg)-Asp-Pro-Tyr-Cys-Ala（またはGly)-Trp）に類似の配列（Gln-Asp-Pro-Val-Cys-Ala-Trp）を一部配列としてコードするDNA「T09073」の配列情報をもとに、その全塩基配列を決定したDNAであり、配列表の配列番号：1に記載されたラットセマフォリンWの塩基配列の第1561位から第1756位に、また配列表の配列番号：4に記載されたヒトセマフォリンWの塩基配列の第922位から第1117位に相当するDNA断片である。

また、ここで「ストリンジェントな条件」は、前記本発明の第2態様の項に記載の条件を指す。

本態様の遺伝子は、配列番号：7のDNAとのハイブリダイゼーション等によりクローニングされるものであるが、具体的には、例えば TINS, 15, 319-323(1992)およびこの引用文献記載の方法によって行うことができ、さらに具体的には例えば以下の方法により行うことができる。

即ち、配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNAをプローブとして、各種動物の組織から調製したcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより行うことができる。スクリーニング方法としては、例えば、実施例3に示したような方法が挙げられる。また、cDNAライブラリーとしては成人の中枢神経系の組織由来のcDNAライブラリーを用いることが好ましく、更に好ましくは海馬、線条体、小脳由来のcDNAライブラリーを用いる。ハイブリダイゼーションの条件は、

例えば前述のように実施例 3 に示した条件、あるいは TINS, 15, 319-323 (1992) およびこの引用文献等に記載されている条件が挙げられる。

また、本態様の遺伝子は、「セマフォリンドメインを有するタンパク質をコードする DNA」でもある。ここで「セマフォリンドメイン」とは、例えば Cell, 75, 1389-1399(1993) または Neuron, 14, 941-948(1995) に記載された既知の 10 個のセマフォリン(G-Sema I, T-Sema I, D-Sema II, H-Sema III, C-Collapsin, Sem A, Sem B, Sem C, Sem D, Sem E) のいずれか 1 つのセマフォリンドメインを構成するアミノ酸と 20% 以上が一致し、かつ 300-600 のアミノ酸残基からなる配列で構成されるドメインをいう。特に好ましいものとしては、30% 以上のアミノ酸が一致するセマフォリンドメインを有するものが挙げられる。ここで、アミノ酸の一致は、例えば日立ソフトウェアエンジニアリング社製の DNASIS Ver. 2.0 を、ktup=1, cutoff=1 の条件で比較することによってなされる。さらに好ましくは、既知の 10 個のセマフォリンのセマフォリンドメインにおいて保存されている 13 個のシステイン（このシステインは例えば Neuron, 14, 941-948(1995) の 942 頁図 1 においてマークされているものが挙げられる）のうち、10 個以上が保存されたものが挙げられ、特に 12 個以上が保存されたものが好ましい。

このような本態様の遺伝子の具体例としては、配列番号：7 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、セマフォリンドメインを有し、かつ神経伸長抑制活性を有するようなセマフォリン遺伝子、あるいは前記第 2 態様と同様の哺乳類、鳥類の全てのセマフォリン W 遺伝子が挙げられる。

本発明の第 4 の態様は、前記本発明の第 1 ～第 3 態様のいずれか記載の遺伝子を発現することによって得られるタンパク質である。

本態様に含まれるタンパク質の代表例として、配列番号：3に記載のアミノ酸配列を有するラットセマフォリンW、あるいは配列番号：6及び配列番号：11に記載のアミノ酸配列を有するヒトセマフォリンWが挙げられる。またセマフォリンWはN末端にシグナル配列を有し、該シグナル配列は膜に移行する際にプロセッシングを受けて除去され、成熟型セマフォリンWとなる。ラットの成熟型セマフォリンWは配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第40位以降のアミノ酸配列からなると考えられ、ヒトの成熟型セマフォリンWは配列番号：11に記載のアミノ酸配列の第28位以降のアミノ酸配列からなると考えられる。このようなシグナル配列の除去された成熟型セマフォリンWあるいはその改変タンパク等も、前記本発明の第1～第3態様のいずれか記載の遺伝子を発現することによって得られるため、本態様に含まれるものである。

次に本態様のタンパク質の調製法であるが、たとえばクローニングされたラットセマフォリンW cDNAを、pET、pCDM8等の公知の発現ベクターに連結した後、適当な宿主に導入することにより発現・生産することができる。宿主としては、原核性生物細胞または真核性生物細胞のいずれでもよく、例えば大腸菌株や動物細胞株は既に広く普及しており入手は可能である。例えば動物細胞宿主としては、COS-1、COS-7、CHO細胞等が挙げられる。

発現プラスミドを用い適当な動物細胞宿主を形質転換するには、例えばDEAEデキストラン法（F. M. Ausubelらの編纂によるCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987)）等の公知の方法を用いればよい。実施例6及び7にて確認したように、セマフォリンWは細胞膜画分に存在しており、この細胞膜画分はそのまま種々のアッセイに使用され得る程度のセマフォリンWを含んでいる。従って、適当な細胞を用いて

調製した細胞膜画分を用いて、本態様のタンパク質の種々の活性測定を容易に行うことができる。

また本態様のタンパク質は、後述の本発明の第16態様のセマフォリンW認識抗体を用いたアフィニティー精製、あるいは通常のカラムクロマトグラフィー等の方法により精製することができる。

本発明の第5の態様は、配列番号：3に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経の伸長に対して促進的に作用するタンパク質をコードする遺伝子である。また本発明の第6の態様は、本発明の第5態様の遺伝子を発現することによって得られるタンパク質である。

上記第5態様の遺伝子における欠失、置換及び／又は付加は、本発明の第1態様の改変タンパク質をコードする遺伝子と同様の手法により行うことができる。また、神経の伸長に対する促進的な作用は、例えば本発明の第1態様の項に記載のセマフォリンW活性測定系にセマフォリンWを添加し、さらにそこへ被験物質（すなわち候補となるセマフォリンW改変タンパク質）を添加することにより、容易に測定することができる。詳しくは本発明の第18態様の項を参照されたい。

本発明の第6態様のタンパク質の具体例として、セマフォリンWの有する神経伸長抑制活性を消失させたような、ラットあるいはヒト型のセマフォリンW改変タンパク質が考えられる。セマフォリンWの活性を消失させた改変タンパク質が、セマフォリンWの代わりに該セマフォリンWのリセプター、あるいはセマフォリンWそのものに結合することなどによってセマフォリンWがリセプターに結合するのを阻害することにより、上述の神経の伸長に対する促進活性を発揮することが考えられる。本発明の第1態様の項に記載したように、セマフォリンの活性部位はセマフォリンドメイン

内に、そしてラットセマフォリンWにおいてはおそらく配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第204位のグルタミン酸に、またヒトセマフォリンWにおいては配列番号：6に記載のアミノ酸配列の第16位のグルタミン酸に、おそらく存在しているものと示唆される。従って、セマフォリンW活性を、その改変タンパク質において消失させるためには、上記アミノ酸の欠失、置換及び／又は付加は、該セマフォリンドメイン内の保存されたアミノ酸に対して、好ましくは配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第204位のグルタミン酸に対して、また配列番号：6に記載のアミノ酸配列の第16位のグルタミン酸に対して行うのが望ましい。その際、もとのアミノ酸と異なった性質の側鎖を有するアミノ酸への置換が望ましい。ヒト及びラット以外のセマフォリンWにおいても、この第204位に相当する位置にあるアミノ酸、即ち該セマフォリンWのアミノ酸配列をラットあるいはヒトセマフォリンWと最も一致するように並べた場合、配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第204位、配列番号：6に記載のセマフォリンWの第16位に相当する位置にあるアミノ酸に対して改変を行うのが望ましい。

以上のように本発明の第6態様のタンパク質は、神経の伸長に対して促進的に作用するものであるため、後述の第21態様の項に記載の如き中枢神経の再生促進剤となるものが含まれる。

本発明の第7の態様は、ヒトcDNAライブラリー又はヒトゲノムライブラリーからクローニングされるDNAであって、配列番号：1、配列番号：4又は配列番号：10に記載のラット又はヒト型セマフォリンWDNAの少なくとも一部からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAである。

クローニングの方法は、例えば Molecular Cloning 2nd Edt. Cold

Spring Harbor Laboratory Press (1989) 等に詳しく述べられており、具体的には、ハイブリダイゼーションを用いる方法、PCRを用いる方法等が挙げられる。ライブラリーとしては、ここではヒト由来のゲノム性ライブラリーを用いることが好ましく、成人の中枢神経由来のcDNAライブラリーを用いることもできる。ハイブリダイゼーションを用いる方法の場合は、例えば TINS, 15, 319-323 (1992) 及びこの引用文献等に従い行うことができる。またPCR法を用いる場合は、McPherson らの編纂による PCR (1991) IRL Press 等に従い行うことができる。

クローニングされるDNAはその全長に限らず、そのうちの 200塩基以上からなるDNA断片、あるいは該DNA断片の一本鎖（正鎖、あるいは相補鎖）の形態のものも含む。本発明の第7態様のDNAの具体例としては、アミノ酸をコードする領域は言うに及ばず、5'、3' 転写調節領域、エキソンのノンコーディング配列、イントロンなどを含む染色体DNAが挙げられる。これらアミノ酸をコードしない配列も、後述のアンチセンス技術を用いて薬剤を開発する場合などに非常に有用である。

本発明の第8の態様は、本発明の第1、第2、第3又は第5態様の遺伝子、あるいは第7態様のDNAのいずれかを発現する発現プラスミドである。また、本発明の第9の態様は、第8態様の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体である。また本発明の第10の態様は、第9態様の形質転換体を培養し、発現される組換えタンパク質を回収することからなる、組換えタンパク質の生産方法である。これら発現プラスミド及び形質転換体の作製方法、あるいは組換えタンパク質の生産方法は、本発明の第4の態様の項に記載したように、全て当業者にとって周知の方法である。

本発明の第11の態様は、本発明の第4態様又は第6態様のタンパク質の、少なくとも6アミノ酸以上の部分よりなるペプチドである。ここで、

「少なくとも6アミノ酸以上」との限定は、安定な構造をとり得る最小のサイズが6アミノ酸であることによるが、好ましくは8アミノ酸以上の部分よりなるペプチドが、より好ましくは10～20個程度のアミノ酸からなるペプチドが好ましい。該ペプチドは、10～20個程度の短いものであればペプチド合成装置により合成することができるし、長いものであれば通常の遺伝子工学的手法により調製されたDNAを、上述の動物細胞等により発現させることにより得ることができる。なお、このようにして作製されたペプチドを、通常の方法により修飾することも可能である。

これらペプチドは、後述の第12、第13態様の項に記載の医薬への応用が可能である他、抗体作製のためにも使用することができる。

本発明の第12の態様は、本発明の第11態様のペプチドのうち、神経の伸長に対して促進的に作用するものである。該ペプチドは、前記第11態様の項に記載の方法で作製することができる。また神経の伸長に対する促進的な作用は、本発明の第5態様の項に記載の如く、本発明の第1態様の項に記載の活性測定系にセマフォリンWを添加し、さらにそこへ被験物質（すなわち候補となるセマフォリンWのペプチド）を添加することにより、容易に測定することができる。詳しくは本発明の第18態様の項を参照されたい。

これらペプチドの具体例として、セマフォリンWの有する神経の伸長抑制作用を消失させたペプチドが考えられる。セマフォリンW活性を有さないペプチドがセマフォリンWのレセプター、あるいはセマフォリンWそのものに結合することによって、セマフォリンWがそのレセプターに結合するのを阻害し、神経の伸長促進作用を発揮すると考えられる。このようなペプチドは、後述の第21態様の項に記載のように、中枢神経の再生促進剤となるものが存在する。

本発明の第13の態様は、本発明の第11態様のペプチドのうち、配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第204位のグルタミン酸、あるいは該グルタミン酸の位置に相当するアミノ酸を含有することを特徴とするペプチドである。該ペプチドは、前記第11態様に記載の方法にて作製することができる。

本発明の第1態様の項に記載したように、配列番号：3に記載のラットセマフォリンWの第204位のグルタミン酸（配列番号：6に記載のヒトセマフォリンWでは第16位のグルタミン酸）は、セマフォリンWの活性発現に重要であると考えられるアミノ酸である。従ってこのアミノ酸は、セマフォリンWとそのレセプターとの結合に関与している可能性があり、それゆえ該アミノ酸、あるいは該アミノ酸の位置に相当するアミノ酸を含有する本態様のペプチドは、セマフォリンWのレセプター、あるいはセマフォリンWそのものに結合することによってセマフォリンWがそのレセプターに結合するのを阻害し、セマフォリンWの有する神経の伸長抑制作用を阻害する（すなわち神経の伸長を促進する）ことが可能である。このような作用を有するペプチドは、後述の第21態様の項に記載のように、中枢神経の再生促進剤となるものが存在する。なお該神経の伸長促進活性は、本発明の第5態様の項に記載の如く、本発明の第1態様の項に記載の活性測定系にセマフォリンWを添加し、さらにそこへ被験物質（すなわち候補となるセマフォリンWのペプチド）を添加することにより容易に測定することができる。詳しくは本発明の第18態様の項を参照されたい。

なお、ここで「該グルタミン酸の位置に相当するアミノ酸」とは、本発明の第4又は第6態様のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：3に記載のラットセマフォリンWのアミノ酸配列と最も一致するように並べた場合、ラットセマフォリンWの204位に相当する位置にあるアミノ酸を指す。

従って、「該グルタミン酸の位置に相当するアミノ酸を含有することを特徴とするペプチド」とは、このラットセマフォリンWの第204位に相当する位置にあるアミノ酸を有し、かつその前後のアミノ酸からなるペプチドを指す。

本発明の第14の態様は、本発明の第1～第3態様のいずれか記載の遺伝子、あるいは第7態様のDNAの、少なくとも8塩基以上の部分に対応するアンチセンスヌクレオチド、あるいはその化学的修飾体である。

ここで「アンチセンスヌクレオチド」とは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、もしくは、アンチセンスRNA又はアンチセンスDNAなどと呼ばれるものを指し、合成機を用いて人工的に合成したり、通常と逆の向き（すなわちアンチセンスの向き）に遺伝子を発現させることなどによって得ることができる。詳しくは、本発明の第21態様の項を参照されたい。

これらアンチセンスヌクレオチドは、後述の第15態様の項に記載したようなセマフォリンWの発現を抑制する目的で使用される他、*in situ*ハイブリダイゼーション等の研究用試薬としても有用である。また、本発明において「化学的修飾体」とは、具体的にはアンチセンスヌクレオチドの細胞内への移行性または細胞内での安定性を高めることができる化学的修飾体を表し、例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホトリエステル、アルキルホスホナート、アルキルホスホアミデート等の誘導体（"Antisense RNA and DNA" WILEY-LISS刊 1992 P.1-50、J. Med. Chem. 36, 1923-1937(1993)）が挙げられる。この化学的修飾体は、同文献等に従って調製することができる。

本発明の第15の態様は、本発明の第4態様のタンパク質の発現を抑制することを特徴とする、前記第14態様のアンチセンスヌクレオチド、あるいはその化学的修飾体である。

通常の遺伝子の転写によって生産されるmRNAはセンス鎖であるが、アンチセンスヌクレオチドあるいはその化学的修飾体は、細胞内でセンス鎖mRNAに結合し、該遺伝子の発現を抑制することができる。従って、該アンチセンスヌクレオチドあるいはその化学的修飾体は、セマフォリンWの発現を抑制することができ、該発現を抑制することによりセマフォリンWの有する活性を抑制することができる。このような効果を有するアンチセンスヌクレオチドあるいはその化学的修飾体には、後述の本発明の第21態様の項に記載の如く、中枢神経の再生促進剤となるものが存在する。

作製したアンチセンスヌクレオチドあるいはその化学的修飾体が目的の抑制効果を有しているか否かは、セマフォリンWを発現する細胞に外からアンチセンスオリゴヌクレオチドそのものを直接導入するか、或いは転写によって該アンチセンスRNAを生成する遺伝子を導入し、該セマフォリンWの発現量が減少するか否かを指標にして、容易に見い出すことができる。

この抑制効果を有するアンチセンスヌクレオチドとしては、上記各態様のセマフォリン遺伝子のコーディング部分、5'ノンコーディング部分のいずれの部分に対するものであっても良いが、好ましくは転写開始部位、翻訳開始部位、5'非翻訳領域、エクソンとイントロンとの境界領域もしくは5'CAP領域に対するアンチセンスヌクレオチドであることが望ましい。

本発明の第16の態様は、本発明の第4又は第6態様のタンパク質、あるいは第11～第13態様のペプチドに対する抗体である。該抗体は、マウスやウサギを用いて、例えばカレント プロトコルズ イン イムノロジー2.4.1-2.6.6 頁（1992刊、ジェー・イー・コリガン編集）に記載された方法により、容易に作製することができる。また前記参考書に述べられている手法を用いることで、容易にモノクローナル抗体を作製することも

可能である。該抗体の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、cDNAライブラリーのスクリーニング、あるいは医薬・診断薬・研究用試薬等が挙げられる。該抗体の中にはセマフォリンWに対する中和活性を有するものが存在する。これら中和活性は、本発明の第5態様の項に記載の如く、本発明の第1態様の項に記載の活性測定系にセマフォリンWを添加し、さらにそこへ被験物質（すなわち候補となるセマフォリンWの抗体）を添加することにより、容易に測定することができる。そして該中和抗体には、本発明の第21態様の項に記載の如く、中枢神経の再生促進剤となるものが存在する。

本発明の第17の態様は、本発明の全ての遺伝子（DNA）、タンパク質、ペプチド、アンチセンスヌクレオチド又はその化学的修飾体、あるいは抗体の、いずれかを有効成分として含有する医薬である。

該医薬のうち、中枢神経の再生促進剤及び末梢神経の伸長抑制剤については本発明の第21及び第22態様の項に記載した。従ってこれら用途については、該21及び22態様の項を参照されたい。

近年、ある種のセマフォリンが、神経系のみならず非神経系においても重要な機能を担っていることが明らかになりつつある。すなわち、心筋の成長抑制に働いているという可能性が示唆されている（Nature, 383, 525-528(1996)）。また、免疫系においても、ある種のセマフォリンがBリンパ球の凝集及び生存維持に関与していることが示唆されている（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 11780-11785(1996)）。さらに最近、ある種のセマフォリンがリウマチにおける免疫反応において何らかの役割を担っていることも示唆されている（B. B. R. C., 234, 153-156(1997)）。また、肺癌への関与も示唆されている（Proc. Natl. Acad. Sci USA, 93, 4120-4125(1996)）。

従って本発明のセマフォリンW、あるいはその改変タンパク質、ペプチド、アンチセンスヌクレオチド等が、抗アレルギー剤、免疫抑制剤、あるいは抗癌剤として利用できることが考えられる。なお、これら医薬の具体的な用法・用量等については、本発明の第21又は第22の態様の項を参照されたい。

本発明の第18の態様は、本発明の第4態様のタンパク質を用いることを特徴とする、セマフォリンWアンタゴニストのスクリーニング方法である。ここで、「セマフォリンWアンタゴニスト」とは、例えばセマフォリンWの有する神経の伸長抑制作用を阻害する物質を指す。

該スクリーニングは、本発明の第1態様の項に述べたセマフォリンW活性測定系にセマフォリンWを添加し、さらにそこへ被験物質を添加することによって行う。即ち、セマフォリンWを添加して行うセマフォリンWの活性測定実験において、培養の期間を通して或いはその一時期だけ、被験物質を培養液に添加することによって、セマフォリンWの活性が阻害されることを指標とする。また、同濃度の被験物質単独では神経細胞の生存、突起伸長などに対して影響しないことを確認することも重要である。この両者が満たされた場合、この被験物質をセマフォリンWアンタゴニストと認定することができる。被験物質はあらかじめ水溶液であることが好ましいが、DMSOなどの有機溶媒を溶媒として用いることもできる。いずれの場合も神経細胞に対する溶媒の影響を除くために、加える体積は最小限にすることが大切であり、具体的には培養液に対して等量以下、好ましくは1/10以下、更に好ましくは1/100以下になるようにする。このようにして得られたセマフォリンWアンタゴニストには、後述の本発明の第21態様の項に記載したように、中枢神経の再生促進剤となるものが存在する。

本発明の第19の態様は、本発明の第18態様のスクリーニング方法を

用いて得られるセマフォリンWアンタゴニストである。該アンタゴニストは、セマフォリンWの活性を阻害する物質であればその構造・形状等は問わない。

本発明の第20の態様は、本発明の第6態様のタンパク質、第11～第13態様いずれか記載のペプチド、あるいは第16態様の抗体からなる、第19態様のセマフォリンWアンタゴニストである。すなわち、本発明の第6態様のタンパク質、第11～第13態様いずれか記載のポリペプチド、あるいは第16態様の抗体のうち、セマフォリンWの有する活性を阻害する効果を有するものである。これらアンタゴニストは、本発明の第18態様のスクリーニング系に上記いずれかの物質を供することにより選り出すことができるものであり、選り出された該アンタゴニストには、後述の本発明の第21態様に記載の如き中枢神経の再生促進剤となるものが含まれる。

本発明の第21の態様は、本発明の第14又は第15態様のアンチセンスヌクレオチド又はその化学的修飾体、あるいは第19又は第20態様のセマフォリンWアンタゴニストの少なくとも一つを含有することを特徴とする、中枢神経の再生促進剤である。本態様は「中枢神経の再生治療」という用途に係わるものであるため、以下、具体例を挙げて用法・用量等につき説明する。

1) アンチセンスヌクレオチドあるいはその化学的修飾体

種々の疾患に対してアンチセンスヌクレオチドの適用が試みられているが、近年、神経系疾患に対しても、該アンチセンスヌクレオチドが適用可能であるとの認識がなされている（TINS 20, No. 8, 321-322 (1997)）。

本発明の第14又は第15態様の項に記載したように、本発明の第14又は第15態様のアンチセンスヌクレオチドまたはその化学的修飾体を用

いてセマフォリンW遺伝子の発現を制御することができるため、セマフォリンタンパク質の存在量を減らし、中枢神経の再生を促進することができると思われる。治療方法としては、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体をそのまま投与方法、およびアンチセンスRNAを細胞内で生産する方法がある。

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体をそのまま投与方法において、このアンチセンスオリゴヌクレオチドの好ましい長さとしては、例えば5-200塩基のものが挙げられ、さらに好ましくは8-25塩基が挙げられ、特に好ましくは12-25塩基のものが挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体を安定化材、緩衝液、溶媒などと混合して製剤化した後、投与時には抗生物質、抗炎症剤、麻酔薬などと同時に用いることもできる。こうして調製された製剤は様々な方法で投与可能であるが、好ましくは神経の障害の著しい部位に局所的に投与される。神経の再生は通常数日から数カ月を要するものであり、その間、投与は連日または数日から数週間おきになされる。また、このような頻回の投与を避けるために徐放性のミニペレット製剤を調製し患部近くに埋め込むことも可能である。あるいはオスモチックポンプなどを用いて患部に連続的に徐々に投与することも可能である。通常投与量は作用部位における濃度が0.1nM-10 μ Mになるように調製する。

一方、アンチセンスRNAを細胞内で生産する方法において、このアンチセンスRNAの好ましい長さとしては、例えば100塩基以上が挙げられ、好ましくは300塩基以上が挙げられ、さらに好ましくは500塩基以上が挙げられる。

アンチセンスRNAを産生する遺伝子の患者への導入方法としては、直接生体内の細胞に遺伝子を導入するin vivo法、及び体外である種の細胞

に遺伝子を導入し、その細胞を体内に戻すex vivo法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48（1994）、実験医学増刊、12(15)、（1994）、およびこれらの引用文献等）が、in vivo法がより好ましい。

in vivo法としては、組換えウイルスを用いる方法及びその他の方法（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、全頁(1994)、及びこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

組換えウイルスを用いる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のウイルスゲノムにアンチセンスRNAを産生する遺伝子を組み込んで生体内に導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、リポソーム法、リポフェクチン法等が挙げられ、特にリポソーム法が好ましい。

ex vivo法としては上記方法以外にマイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等も用いることができる。

患者への投与方法は、治療目的の疾患、症状などに応じた適当な投与経路により投与される。例えば、静脈、動脈、皮下、筋肉内等に投与するか、または神経などの疾患の対象部位に直接投与することができる。例えば、脊髄に感染させると脊髄で特異的にセマフォリン遺伝子の発現が抑制される。通常、本願のアンチセンスヌクレオチドの発現は数日から数カ月持続し、この1回の感染で神経の再生が十分に起こる。発現が弱いときは、再感染することもできる。in vivo法により投与される場合は、製剤形態（例

えば、液剤など）をとりうるが、一般的には有効成分であるアンチセンスヌクレオチドを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体等を加えてもよい。また、アンチセンスヌクレオチドを含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）ーリポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリポソーム製剤の形態とすることができる。

製剤中のアンチセンスヌクレオチドの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調節することができるが、通常アンチセンスヌクレオチドとして、0.0001-100mg、好ましくは0.001-10mgであり、これを1回もしくは2回以上投与する。2回以上投与するときは連日あるいは適当な間隔をおいて繰り返し投与することが望ましい。

2) セマフォリンWの改変タンパク質

本発明の第5、第6態様の項に記載したように、セマフォリンWの有する中枢神経伸長抑制活性を消失させた改変タンパク質を作製することができ、該改変タンパク質を生体内に投与することにより、セマフォリンWの代わりに該セマフォリンW改変タンパク質がセマフォリンWのリセプターに結合し、その結果、セマフォリンWの活性が抑制され、中枢神経の再生が促進されることが考えられる。

治療においては該セマフォリンWの改変タンパク質を安定化剤、緩衝液、希釈液と共に製剤化して患者に投与する。投与は様々な方法で可能であるが、好ましくは病床部位に局所的に投与する。神経の再生には通常数日から数カ月を要するので、その間セマフォリンWの活性を抑制するために1回もしくは2回以上投与する。2回以上投与するときは連日あるいは適当な間隔をおいて繰り返し投与することが望ましい。注射によって中枢神経系、例えば脊髄内に投与するときは、一回当たり数百 μ g から2g、好ま

しくは数十mg以下を用いる。投与回数を減らすために徐放性製剤を利用したり、オスモティックポンプなどで長期間に渡って少量ずつ投与する方法も可能である。あるいは該セマフォリンW改変タンパク質を発現する細胞を生体内に移植することによっても可能である。

3) セマフォリンWのペプチド

本発明の第11～第13態様のペプチドの中には、セマフォリンWの受容体への結合を阻害することによって、セマフォリンWの有する中枢神経の伸長抑制活性を抑制し、その結果、中枢神経の再生を促進するものが存在する。このような効果を有するペプチドの具体例として、例えば本発明の第13態様の項に記載したように、配列番号：3に記載のラットセマフォリンWの第204位のグルタミン酸、或いは該グルタミン酸の位置に相当するアミノ酸を含有することを特徴とするペプチドが挙げられる。なお阻害の様式は、競争阻害、非競争阻害、不競合阻害、アロステリック阻害のいずれの様式であるかを問わない。

これらポリペプチドの製剤化、投与方法、投与量については上記「2) セマフォリンWの改変タンパク質」の項を参照されたい。

4) セマフォリンWの抗体

セマフォリンWの活性を中和する中和抗体を生体内に投与することにより、セマフォリンWの活性が阻害され、中枢神経の再生治療が促進されることが考えられる。

該中和抗体の製剤化、投与方法、投与量については上記「2) セマフォリンWの改変タンパク質」の項に記載の通りであるが、別の方法として、Nature, 343, 269-272(1990)に記載されているように、モノクローナル抗体を産生する細胞を直接中枢神経系に移植する方法も可能である。

本発明の第22の態様は、本発明の第4態様のタンパク質の少なくとも一つを含有することを特徴とする、末梢神経の伸長抑制剤である。本発明の第4態様のタンパク質は、中枢神経の伸長に対して抑制的に作用し得るが、同時に末梢神経にもセマフォリンWに対するリセプターが発現している可能性があること、また、他のセマフォリンのリセプターがセマフォリンWに対しても反応する可能性があることなどから、末梢神経に対してもその伸長を抑制することが考えられる。従って末梢神経の伸長を抑制することにより、アトピー性皮膚炎、疼痛等の治療薬となることが考えられる。

これらタンパク質の製剤化、投与法、投与量については上記「2）セマフォリンWの誘導タンパク質」の項を参照されたい。

本発明の第23の態様は、本発明の第1～第3又は第5態様の遺伝子、あるいは第7態様のDNAのいずれかを人為的に染色体中に挿入したか、あるいはいずれかをノックアウトさせたトランスジェニック動物である。

本発明のセマフォリンWの遺伝子情報を持ってすれば、以下の文献（ビー＝ホーガンらの編纂によるマニピュレーションオブマウスエンブリオ 1986年コールドスプリングハーバーラボラトリー、相澤慎一著 ジーンターゲットティング 1995年 羊土社、など）で明らかなように、現在の技術レベルでは当該領域の研究者にとって本発明の第1、第4、第7又は第9態様の遺伝子を発現するトランスジェニック動物を作製することはいとも簡単であり、こうして得られるトランスジェニック動物も当然のこととして本発明に含まれるものである。このようにして得られたトランスジェニック動物は医薬品開発のためのモデル動物として、あるいは医薬品のスクリーニング用の動物として非常に有用である。さらに、本発明の第1、第4、第7、第9態様の遺伝子を欠失した動物いわゆるノックアウト動物は当該遺伝子を有しないのが特徴であるが、文献に述べられているようにあるい

は当該領域の研究者の常識として、本発明のセマフォリンWの遺伝子情報を利用して初めて作成が可能なものであり、従って本発明に含まれることは言うまでもない。

なお、上に述べたようにセマフォリンWは神経の再生に関する生体内の重要な機能を担っているが、一方で、前記したように、セマフォリンWはそれ以外の免疫抑制作用などの未知の機能を有している可能性も指摘されており (Cell, 75, 1389-1399 (1993))、該セマフォリンWの遺伝子発現、蛋白の分布、機能などを調べることは当該領域の研究にとって、あるいは神経疾患などの患者の診断にとって非常に重要であり、本発明はかかる目的のために利用可能な遺伝子プローブ、抗体、組換えタンパク質、トランスジェニック動物なども提供することができる。

図面の簡単な説明

図1：ノーザン解析による種々の組織におけるセマフォリンWの発現分布を示す電気泳動の写真。

6週令のラットの組織から全RNAを抽出し、1%寒天-ホルムアミドゲル中で電気泳動し、フィルターにブロッティング後³²Pで標識したラットセマフォリンW DNAプローブでハイブリダイズし、セマフォリンW mRNA発現分布を調べた。各レーン15μgのRNAを泳動した。上図はオートラジオグラムの結果を示し、18S、28SリボソームRNAの位置を図の左端に示した。下図はゲルの臭化エチジウム染色像であり、上下の2本のバンドは、それぞれ、28S、18SリボソームRNA。

図2：ノーザン解析による胎生期及び成体の中枢神経系でのセマフォリンWの発現分布を示す電気泳動の写真。

種々の令数のラット組織から全RNAを抽出し、1%寒天-ホルムアミドゲル中で電気泳動し、フィルターにブロッティング後³²Pで標識したラッ

トセマフォリンWDNAプローブでハイブリダイズし、セマフォリンWmRNA発現分布を調べた。E12、E15、E18、P0は、各々胎生12、15、18日及び出生直後を示す。中枢神経組織内分布(左側の9 レーン) は、全て6週令。各レーン15 μ gのRNAを泳動した。上図はオートラジオグラムの結果であり、18S、28SリボソームRNAの位置を図の左端に示した。下図はゲルの臭化エチジウム染色像であり、上下の2本のバンドは、それぞれ、28S、18SのリボソームRNA。

図3：セマフォリンW蛋白のCOS7細胞における発現を示す電気泳動の写真。

セマフォリンWの発現プラスミド (pUCSR α -rSWsense) を構築し、これをCOS7細胞に導入して一過的に発現させた (図中S)。コントロールにはセマフォリンW遺伝子を逆向きに挿入したプラスミド (pUCSR α -rSWanti-sense) を用いた (図中AS)。プラスミド導入後3日目に細胞を回収し、膜画分を調製した。膜画分をSDS-PAGEで分画後、抗セマフォリンW抗体を用いてウエスタンブロットを行った。抗体は、セマフォリンWの細胞内領域の部分ペプチド (710-731: APPSGTTSYSQDPPSPPEDE) をウサギに免疫することによって得た。図の右側にセマフォリンW蛋白質のバンドの位置を示した。図の左側に分子量マーカーの各バンドの位置と分子量 (kDa: キロダルトン) を示した。

図4：セマフォリンWが神経突起伸長を抑制することを示した顕微鏡写真。

A. ポリカーボネーティッドフィルター上にブロッティングされた膜の状態。セマフォリンWを含むCOS細胞の膜 (W) と、対照のCOS細胞の膜 (C) をこの図の縦向きの縞を形成するようにブロッティングした。縞の間隔は約0.1mm。

B. 続いて上記A. の膜の上にニワトリ 7 日胚より取り出した後根神経節を乗せて培養し、固定、染色の後、蛍光顕微鏡下で撮影したもの。図の白い部分が神経突起である。

C. 上記B. の模式図。DRGは後根神経節の組織片の位置。左には別の組織片が見えている。図から明らかなように、セマフォリンWを含む膜上では突起の伸長が抑制されている。

図5：セマフォリンWの成長円錐退縮活性を示すグラフ。ニワトリ 6 日胚から取り出した網膜神経節細胞を一夜培養し、セマフォリンW発現プラスミドをトランスフェクションしたCOS細胞から調製した膜抽出物（黒）とベクターのみをトランスフェクションしたCOS細胞から調製した膜抽出物（白）を、図に示した濃度（横軸）になるように添加し、更に45分間培養を続けた後固定し、顕微鏡下で退縮した成長円錐の割合（%：縦軸）を計測した。

図6：ノーザン解析による生体組織でのセマフォリンIII の発現分布を示す電気泳動の写真。

成体マウスの種々の組織から全RNAを抽出し、1%寒天ーホルムアミドゲル中で電気泳動し、フィルターにブロッティング後、 ^{32}P で標識したマウスセマフォリンIII DNAプローブでハイブリダイズし、セマフォリンIII mRNA発現分布を調べた。各レーン $15\mu\text{g}$ のRNAを泳動した。上図はオートラジオグラムの結果を示し、18S, 28S リボソームRNAの位置を図の左端に示した。下図はゲルの臭化エチジウム染色像であり、上下の2本のバンドは、それぞれ、28S、18S のリボソームRNA。

実施例

基本的な実験方法はManiatisらによって編纂された Molecular Cloning 2nd Edt. (Cold Harbor Laboratory Press, 1989), Ausubelらによって編

纂されたCurrent Protocols in Molecular Biology(John Wiley & Sons, 1987) および東京大学医科学研究所制癌研究部編纂の細胞工学実験プロトコール(秀潤社、1991)などの多くの出版物に詳しく記載されている。尚、本発明は以下の実施例にのみ限定されるものでなく、本発明の技術分野における通常の変更ができることは言うまでもない。

実施例 1

新規セマフォリン遺伝子のデータベースからの検索

ナショナルセンター フォー バイオテクノロジー リサーチ (アメリカ合衆国メリーランド州ベセスダ) のディービーイーエスティー (dbEST) データベースを用い、既知のセマフォリン遺伝子に於いてよく保存されているアミノ酸配列をコードしているDNA配列を検索した。その結果、T09073が既知のセマフォリン遺伝子間で非常に良く保存された7個のアミノ酸からなる配列 (Gln(またはArg)-Asp-Pro-Tyr-Cys-Ala(またはGly)-Trp) と似た配列であるGln-Asp-Pro-Val-Cys-Ala-Trpを一部配列としてコードすることを見い出した。しかしながら、この配列は364bpと短く、また解読されていない塩基が有り、読み枠も決定できないなどの理由から、目的とする新規セマフォリン遺伝子の一部であるとは結論できなかった。また、この配列を有する遺伝子の詳しい発現分布も不明であった。そこで、まずこの遺伝子の発現分布を調べ、主に成体の中枢神経系に発現しているという本発明の目的にかなうものであることを確認した後、遺伝子の全長をクローニングし、新規セマフォリン遺伝子であることを判断することにした。

実施例 2

T09073を有する遺伝子の発現分布

上記T09073を一部配列として有する遺伝子の発現分布をノーザン法によ

り調べた。T09073はヒト小児脳のcDNAライブラリー由来の配列としてデータベースに登録されていることからヒトの遺伝子配列であると考えられるが、ノーザン解析は試料の調製の容易さを考えラットを対象とした。成体と胎児のラットの種々の組織からのRNAの調製は、エージーピーシー法（辻孝、中村敏一；実験医学1991年9巻 1937-1940頁、エフ・エム・アウスベルら編 カレントプロトコルズインモレキュラーバイオロジー1989年 4.2.4-4.2.8頁（グリーンアソシエイツアンドウィリーインターサイエンス社））により行った。簡単に述べると、切り出した組織1g当たり10mlの変性溶液（4Mグアニジンチオシアン酸、25mMクエン酸ナトリウム（pH7.0）、0.5%サルコシル、0.1M2-メルカプトエタノール）を加えポリトロンホモゲナイザーを用いて素早くホモゲナイズした。その後、0.1容の2M酢酸ナトリウム（pH4.0）、一容の水飽和フェノール、0.2容のクロロホルム-イソアミルアルコール（49:1）を加えて激しく攪拌した後、遠心して水層を分取し、イソプロピルアルコールを等容加えて-20℃で1時間放置した。遠心で沈殿を回収し、再び1g組織当たり2-3mlの変性溶液に溶解、等容のイソプロピルアルコールを加え-20℃1時間静置した後、RNAを遠沈した。75%のエチルアルコールで沈殿を洗い軽く乾燥させた後適当な体積の水に溶解した。

続いて、以下に述べる通常の方法でRNAの電気泳動とノーザンブロッティングを行った。まず、様々な組織から調製したRNAをホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲル中で電気泳動した。そのゲルを50mMNaOHで20分間振とうした後、10×SSPE（ここで1×SSPEとは0.15M塩化ナトリウム、10mMリン酸二水素ナトリウム、1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムの混合物をpH7.0に調製したものを表す）中で40分間振とうした。その後、RNAを毛細管現象を利用してナイロン膜（バイオダインB、日本ポール

社製) にブロッティングし、ストラタジーン社のUVクロスリンカーを用いて固定し ($0.6\text{J}/\text{cm}^2$) ハイブリダイゼーションに用いるナイロン膜を得た。プローブとしては、T09073の 5' 側 196塩基対よりなるDNA断片を合成し、これをアマーシャム社製メガプライムDNAラベリングシステムを用いて ^{32}P で標識したものをを用いた。ハイブリダイゼーション反応は、RNAをブロッティングしたナイロン膜とプローブDNAを上記(2)と同様のハイブリダイゼーション溶液中で 42°C 48時間放置して行った。反応後、ナイロン膜を 42°C の2XSSPE、0.5%(w/v)SDS中で10分間 2-3回洗浄した後、更に、 55°C の2XSSPE、0.5%SDS(w/v)中で10分間 2-3回洗浄した後、膜上の放射活性をBAS2000バイオイメージアナライザーで解析した。その結果、図1及び図2に示したように、この遺伝子は成体の中枢神経組織では広く発現しているが、それ以外では胎児期、生後を通じて成体の肺および脾臓のみで発現していることが確認され、中枢神経再生阻止因子の遺伝子として期待される発現分布を示すことが明らかになった。

実施例3

ラットセマフォリンW遺伝子のクローニング

上記T09073の配列を有する遺伝子が、実際に新規セマフォリン遺伝子に相当するものであるか否かを確認するために、前記実施例2で調製した196bpのDNA断片をプローブに用いてこの遺伝子の全長をクローニングし、配列を決定することにした。試料調整の容易さから、まずラットの遺伝子をクローニングすることとした。ラット脳及び筋肉から通常の方法で調製したmRNAとラムダザップター (λ ZapII) cDNAライブラリー作製キット (ストラタジーン社製) とを用いて、前記実験書に紹介されている通常の方法にてcDNAライブラリーを作製した。続いて、このcDNAライブラリーを用いて寒天プレート上に約15万プラークを作製し、この

ブランクをナイロン膜（日本ポール社製）に写し、DNAの変性、中和を行った後、 $0.6\text{J}/\text{cm}^2$ の紫外線で固定し、ハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションは、このナイロン膜とプローブとなる ^{32}P でラベルした196bpのDNA断片（アマーシャム社製メガプライムDNAラベリングシステムを用いてアマーシャム社のプロトコールに従って作製した）とをハイブリダイゼーション溶液（45%(v/v)ホルムアミド、 $5\times\text{SSPE}$ 、 $2\times\text{デンハルト}$ 溶液（和光純薬製）、0.5%(w/v) SDS、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子DNA（和光純薬製））に入れ、 42°C 48時間静置することにより行った。反応後、ナイロン膜を室温で2-3回 $2\times\text{SSPE}$ 、0.5%(w/v)SDS中で10分間洗浄した後、更に、 42°C で2-3回 $2\times\text{SSPE}$ 、0.5%(w/v)SDS中で10分間洗浄した。こうして得られたフィルターをBAS2000 バイオイメージアナライザー（富士フィルム製）で解析し、6個の陽性シグナルを得た。陽性シグナルの位置にあるブランクを寒天プレートから切り出し、 $20\mu\text{l}$ クロロフォルムを添加した $500\mu\text{l}$ エスエム(SM)バッファー（100mM 塩化ナトリウム、15mM 硫酸マグネシウム、50mM トリス(pH 7.5)、0.01% ゼラチン）に入れた後、 4°C 一晩放置し、ファージを溶出した。こうして得られた組換えラムダファージを先と同様の手順で2次スクリーニングし、単一ブランクを分離した。得られたファージを以下に示すようにストラタジーン社のプロトコールに従って処理し、cDNAインサートを持つファージミドのインビボ切り出しを行った。すなわち、二次スクリーニングから得られた4個のシングルブランクを含む寒天ゲルをそれぞれ $500\mu\text{l}$ のSMバッファーに入れ $20\mu\text{l}$ のクロロホルムを加えた後 4°C 一晩静置した。このファージ溶液 $250\mu\text{l}$ と、 $\text{OD}_{600}=1.0$ になるように10mM塩化マグネシウム中に懸濁した大腸菌XL-1BlueMRF' $200\mu\text{l}$ 、更に、 $1\mu\text{l}$ のエクスアシスト (ExAssist) ヘルパーファージ ($>1\times 10^6$ pfu/ml) とを混ぜ、 37°C 15分間培養した。続い

て、3ml のエルビー培地 (0.5%(w/v) 塩化ナトリウム、1%(w/v) バクトトリプトン (ディフコ社製)、0.5%(w/v) イーストエキストラクト (ディフコ社製) を混合後5M水酸化ナトリウムで pH7.0に調製) を加えて37℃で 2-3時間振とう培養した。2000×g 15分間遠心して菌体を除去し上清を70℃ 15分加熱処理した。その後、再び2000×g 15分間遠心し、上清をcDNA インサートを持ったファージミドの保存液として回収した。このファージミドの保存液10-100 μ l を200 μ l の大腸菌 SOLR(OD₆₀₀ =1.0) に混合し、15分間37℃で培養した後、アンピシリンプレートに 10-50 μ l まき37℃一晚培養し、目的の遺伝子断片の挿入された2本鎖ファージミドを持つ大腸菌株を取得した。

次に、得られたcDNAクローンの塩基配列をパーキンエルマー社の377型DNAシーケンサーを用いて解析し、全塩基配列を決定した。なお、反応にはプリズムダイターミネーションキット (パーキンエルマー社製) を用いた。決定したDNA塩基配列 (4008塩基) を配列番号：1に、また推定されるオープンリーディングフレーム (2331塩基) を配列番号：2に、またアミノ酸配列 (776アミノ酸) を配列番号：3に示す。

この遺伝子は、そのアミノ酸配列の第62位から第567位に、いわゆるセマフォリンドメインを有していたことから、確かにセマフォリンファミリーに属するタンパクであることが確認されたため、この遺伝子をセマフォリンWと名付けた。なお、実施例2及び実施例3でプローブとして使用したT09073の5'側196塩基対部分は、配列番号1に示すセマフォリンW遺伝子の1561番目から1756番目の塩基配列 (配列番号：7に記載の配列) に対応するものであった。また、配列番号1に示すセマフォリンW遺伝子の1561番目から1924番目の塩基配列は、364bpからなるT09073の配列全長に対して87%の一致を示したことから、T09073がヒト型セマフォリンW遺伝

子の部分配列であることが初めて明らかになった。

実施例 4

ヒトセマフォリンWのクローニング

実施例 3 でクローニングされたラット型セマフォリンW cDNAの全長をプローブにして、実施例 3 と同様の方法で、ストラタジーン社より購入したヒト海馬と前脳のcDNAライブラリーをスクリーニングし、クローン#103を得た。実施例 3 と同様の方法でクローン#103の塩基配列を決定したところ、このクローンは、5' 側に配列番号：10に記載の333塩基対からなるcDNA配列を、また3' 側に配列番号：4に記載の2315塩基対からなるcDNA配列を含むものであった。このうち配列番号：10に記載の塩基配列の全ての部分と、配列番号：4に記載の塩基配列の第1位から第1761位までの部分（配列番号：5）は、オープンリーディングフレームの一部であると考えられ、配列番号：10に記載の塩基配列は連続する111個のアミノ酸配列からなるペプチド（配列番号：11）に、また配列番号：5に記載の塩基配列は連続する587アミノ酸からなるペプチド（配列番号：6）に翻訳することができた。これらのアミノ酸配列はラット型セマフォリンWの対応する位置の配列と、82%（配列番号：11）及び92%（配列番号：6）が一致することから、間違いなくヒト型セマフォリンW遺伝子の一部分であることが分かった。また、前記ESTデータベースより見い出された配列(T09073)は、クローン#103に於いては配列番号：4の第922位から第1285位に相当し、この領域での塩基配列は98%の一致が認められた。

なお、上記クローン#103のインサート部分（ヒト型セマフォリンWのcDNA部分）をpBluescriptに組み込んだプラスミド（hSW103）をE. coli SOLR株に導入して得られた形質転換体である E. coli SOLR(hSW103)は、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄

託されている（微生物の表示：E. coli SOLR(hSW103)；受託日：平成9年8月29日；受託番号：FERM BP-6089）。

実施例5

セマフォリンW部分タンパク質の大腸菌における発現と精製

セマフォリンWの細胞内ドメイン部分（配列番号3のアミノ酸配列の第687位～第776位に相当する部分）を大腸菌を用いて発現させ、精製を行った。

まず2本のプライマー（5'-GATAAGGATCCGGGTCGCCGTCAGCAGCGT-3'（配列番号：8）、5'-GGCTGGAATTCATTTTCCCCGGCTTTA-3'（配列番号：9））を用い、セマフォリンW cDNA（配列番号1）を鋳型にして通常の条件でPCRを行い、細胞内ドメインの配列をコードする310bpの断片を得た。続いてこの断片を制限酵素 BamHIとEcoRIとで切断し、同じくBamHIとEcoRI部位で開裂した発現プラスミドpRSETB（インビトロジェン社製）に組み込み、発現プラスミドpRSWincを得た。

このようにして得られたプラスミド、pRSWincを用いて大腸菌BL21(DE3) pLysS（ストラタジーン社製）を形質転換し、アンピシリン50 μ g/mlを含むLBプレート上で一夜培養し、形質転換体を得た。形質転換体から調製したプラスミドの塩基配列を解析し、目的の構造を有していることを確認した。このようにして得られた形質転換大腸菌をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB培地中、37℃で振とう培養し、OD₆₀₀=0.5になった時点でIPTGを終濃度1mMになるように添加し、更に一夜培養した。続いて培養液を5000×g、15分間遠心し、菌体を回収した。回収した菌体の総蛋白をSDS-PAGEで解析し、目的の分子量の蛋白が産生されていることを確認した。

次に、この大腸菌で発現させたSemaW部分タンパク質を、アミノ末端側にあるHisタグとニッケルセファロースとの親和性を利用してアフィニティ

一精製した。方法はキアゲン社のプロトコールに詳しく書かれているが、簡単には、上述のように大腸菌でSemaWタンパク質を発現させ、その菌体1gに対して5mlの割合でA液（6Mグアニジン塩酸、0.1Mリン酸ナトリウム、0.01Mトリス塩酸pH=8.0）を加えてよく懸濁した後、室温で一時間以上攪拌して可溶化した。つづいてこの蛋白溶液をA液であらかじめ平衡をとったNi-NTAレジン（キアゲン社製）と混合し、2時間以上室温で穏やかに攪拌して蛋白をレジンの結合させ、その後このレジンのカラムに充填した。そのカラムを10倍量のA液で洗い、続いて5倍量のB液（8M尿素、0.1Mリン酸ナトリウム、0.01Mトリス塩酸pH=8.0）で、次に5倍量のC液（8M尿素、0.1Mリン酸ナトリウム、0.01Mトリス塩酸pH=6.3）で結合している蛋白を溶出した。溶出の際には溶出液を1カラム体積ごとに分取し、SDS-PAGEでタンパクの溶出を確認した後、目的の画分を濃縮し、使用時まで-20℃で保存した。

こうして得られたタンパクのN末端のアミノ酸配列を分析し、目的の蛋白であることを確認した。なお、このセマフォリンW部分タンパクは、例えば抗体作製用の抗原として利用することができる。

実施例 6

抗セマフォリンW抗体の作製

抗セマフォリンW抗体を作成するためにラットセマフォリンWのN末、C末近傍の配列ALTLPFSGERPRRID, APPSGTTSYSQDPPSPSPEDERを有する多抗原性ペプチドを常法（生化学63巻（1991）1345-1348頁）により合成し、ウサギに免疫した。ウサギへの免疫は通常の方法で行ったが、具体的には、蛋白量にして、0.4mg分の抗原をフロイド完全アジュバントと混合後、ウサギの皮下に免疫した。以後、2週間ごとに4回にわたり0.2mgをフロイドの完全アジュバントと混合し、皮下に免疫した。最後の免疫の1週間後に

全採血を行った。その後、プロテインAカラムを用いて通常の方法で精製を行い、精製モノクローナル抗体を得た。この抗体は、後述の実施例7で示すようにウエスタンブロットに於いてセマフォリンWの予想される分子量に一致する蛋白を認識したこと、また、mycタグをつけたセマフォリンWを抗myc抗体で免疫沈降した際、この抗体が認識する蛋白も沈降されること、更に、N末のペプチドを抗原にして得られた抗体もC末のペプチドから得られた抗体も同じ分子量の蛋白を認識したことなどより、得られた抗体が正しくセマフォリンW蛋白を認識する抗セマフォリンW抗体であると結論づけられた。

実施例7

動物細胞におけるセマフォリンWの発現

配列番号：1に記載のラットセマフォリンW遺伝子の終止コドンの直前にAsp-Ile-Gly-Gly-Glu-Gln-Lys-Lue-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leuの配列からなるMycタグをコードするDNA断片を挿入し、これを発現プラスミドpUCSR α に導入した (pUCSR α -rSWMYC)。

次に、通常の方法によってこのセマフォリンW遺伝子を有する発現プラスミドをCOS7細胞に導入し、3日後に細胞を回収し、次に述べる方法で膜画分を調製した。すなわち、セルスクレーパーを用いて細胞を回収し、回収した細胞を蛋白分解酵素阻害剤の存在下でホモジェナイズし、これを12000g、10分間の高速遠心で沈殿物と上清に分離した。上清を更に100000g、30分間の超遠心分離に供した後可溶性画分を回収し、これを細胞質画分(S100)とした。得られた細胞質画分は使用まで、-80℃で保存した。一方、先の高速遠心の沈殿物はホモジェナイズ溶液で2回洗った後、2倍量の2.25Mしょ糖/PBSに懸濁し、2.25Mしょ糖/PBS液上に重層し、更にその上に0.8Mしょ糖/PBS液を重層した後、12000g、20分間遠心した。下側の界面から膜

画分を回収しその後ホモジェナイズ溶液で2回洗い、この膜画分を使用時まで-80℃で保存した。

このようにして得られた膜画分及び細胞質画分は、SDS-PAGEで分離後、抗Myc抗体9E10(カルバイオケム社製)を用いて常法通りにウエスタンブロッティングを行った。二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識の抗マウスIgG抗体(バイオソース社製)を用いた。ウエスタンブロッティングの結果、セマフォリンW遺伝子を有するプラスミドを導入した時のみ約110kDaの位置に特異的なバンドが観察され、Myc標識のラットセマフォリンW蛋白がCOS細胞で発現し膜に存在していることが確認できた。

さらに、Mycタグの付いていないセマフォリンWの発現プラスミド(pUC SR α -rSWsense)を用い、前記と同様の方法にて膜画分を調製し、先の実施例6で作製した抗セマフォリンW抗体を用いて同様のウエスタンブロッティングを行った結果、約100kDaの特異的なバンドが認識され、先の結果と同様にセマフォリンW蛋白がCOS細胞で発現し膜に存在していることが確認できた(図3)。

実施例8

セマフォリンWの神経突起伸長に及ぼす影響

セマフォリンWの神経突起伸長に及ぼす影響を調べるためにストライプアッセイを行った。ストライプアッセイの方法については文献(Development 101, 685-696(1987))に詳しく述べられているが、簡単に述べると、まず、上記実施例7と同様の方法によりセマフォリンW発現プラスミドをCOS細胞に導入し、セマフォリンWを細胞膜上に発現したCOS細胞より膜画分を調製した。その際対照として、セマフォリンWを発現しない(すなわちセマフォリン遺伝子を挿入していないベクターを導入した)COS細胞からも同様に膜画分を調製した。得られた膜画分を、文献に述べられているよ

うに縞上にスリットの入ったシリコンマトリックスを用いてマイクロポアーポリカーボネートフィルター（コースター社製）上に交互に縞を形成するようにプロットした（縞の幅は約0.1mm）。次にそのフィルターを神経細胞培養培地（F12, 10%FCS, 20ng/ml NGF）中に移し、更にそのフィルター上に、7日令のニワトリ胚より常法により取り出した後根神経節を注意深く置き、37℃、CO₂インキュベーター中で48時間培養した。培養終了後、1%グルタルアルデヒドで固定し、慎重にDiI（モレキュラープローブ社製）を後根神経節中に挿入し、PBS（－）中で37℃、2-3日培養した。その後、蛍光顕微鏡下で、後根神経節から伸びた突起の伸長具合をセマフォリンWを含む膜上と、対照の膜上で比較することで、セマフォリンWの神経突起伸長に及ぼす影響を調べた。このようにして得られた結果を図4に示した。図中、Wで示したところがセマフォリンWを含むCOS細胞の膜をプロットしたところであり、Cで示すところは対照のCOS細胞の膜をプロットしたところである。DiIで神経突起を染色してあるため、神経突起は白く見えているが、一見して明らかなように、セマフォリンWを含む細胞膜上では神経突起の伸長が抑制されることが分かった。生体内では、セマフォリンWは成体の中枢神経系で広く発現しているため（実施例2）、該中枢神経系で神経の伸長が抑制されているものと考えられる。

実施例9

セマフォリンWの成長円錐退縮活性

セマフォリンWが成長円錐退縮活性を持つかどうかを調べるために、以下に述べるように網膜神経節（retinal ganglion）細胞を培養し、界面活性剤を用いて膜画分から可溶化したセマフォリンW蛋白を添加した後の成長円錐の形態変化を調べた。

すなわち、通常の方法でポリリジンとラミニンでコーティングしたディッ

シュ上にニワトリ胎生6日胚より取り出した網膜神経節を置き、培地(F12、10%FCS、20ng/ml BDNF)中で、37℃一夜、CO₂インキュベーターで培養した。翌日、先の実施例7に示したのと同様の方法で調製した膜画分を界面活性剤で可溶化したものを培地中に添加し、さらに30分から1時間培養を続けた。その後、1%グルタルアルデヒドで試料を固定し、顕微鏡下で成長円錐の形態変化を観察した。なお、上記膜画分の可溶化の方法は、例えば文献(Cell 75, 217-227(1993))に述べられている方法を用いることができ、具体的にはセマフォリンWの発現プラスミドを導入しセマフォリンWを発現したCOS細胞と、対照用のベクタープラスミドを導入しセマフォリンWを発現しないCOS細胞とを材料にして、先の実施例7に述べたのと同様の方法で調製した細胞膜画分を1-2%CHAPSで可溶化し、引き続いてF12に対して透析することによってCHAPSを除いた。15000g, 10分間の遠心で不溶物を除いた後、BCAキット(ピアス社製)等を用いた通常の方法で蛋白濃度を測定した後、上記成長円錐退縮活性の測定を行った。なお、実際の調製はすべて4℃で行った。

その結果、図5に示したように、セマフォリンW発現プラスミドを導入したCOS細胞の抽出物を加えた場合は、対照に比べて1.6倍から4.6倍の高率で、成長円錐の退縮が観察された。従ってセマフォリンWは、中枢神経である網膜神経節神経細胞に対して突起伸長阻止活性を有していると考えられる。

参考例1

セマフォリンIIIを用いたセマフォリン活性必須部位の同定

Neuron, 14, 941-948 (1995)に記載のセマフォリンIIIの配列情報をもとにPCR反応を行い、発現プラスミドpUCSR α にセマフォリンIIIの構造遺伝子を組み込んだ。この発現プラスミドをDEAEデキストラン法でCOS7

細胞に導入し、2日後に培養上清に含まれるセマフォリンIIIの活性を、Cell, 75, 217-227 (1993) に記載の方法と同様の方法にてニワトリ後根神経節神経の成長円錐退縮活性を指標に調べたところ、全く活性を示さないクローンが1つ発見された。そこで、このクローンの塩基配列を決定したところ、198番目のアスパラギン酸がグリシンに変化していた。この198番目を含む前後の領域を他の既知の動物のセマフォリンと比較すると、この領域はセマフォリンドメイン内では際だって保存されている領域ではなかったが、このアスパラギン酸に相当する部位だけは一部のセマフォリンでグルタミン酸になっている以外では非常に良く保存されていた。このことから、このアスパラギン酸が活性発現に必須であることが示唆された。次にこの遺伝子に通常の方法で部位特異的突然変異を導入し、このグリシンをアスパラギン酸に修復したところ強い退縮活性が回復したため、この発現プラスミドのこれ以外の領域は正常に機能することを確認した。以上より、セマフォリンIIIの198番目のアスパラギン酸がセマフォリンの機能発現に必須であると考えられる。なおこのアスパラギン酸に相当するのが配列番号3のセマフォリンWのアミノ酸配列では204番目のグルタミン酸である。

参考例2

ノーザン解析によるセマフォリンIIIの組織特異的遺伝子発現

マウスの組織におけるセマフォリンIII遺伝子の発現分布を調べるために成体マウスの種々の組織からRNAを調製し、ノーザン解析を行った。RNAの調製、ブロッティング、ハイブリダイゼーションは、実施例2と同様の方法によって行った。プローブには参考例1に記載したマウスセマフォリンIII DNAの560bpのMspI断片を用いた。その結果、図6に示したように、成体におけるセマフォリンIIIの発現は、末梢器官である肺に

において非常に強い一方、中枢神経系ではむしろ弱いことが分かった。

発明の効果

本発明によって、神経の伸長に対し抑制的に作用するセマフォリンW及びその遺伝子、該セマフォリンW遺伝子にハイブリダイズする他のセマフォリン、該セマフォリンWの改変タンパク質、部分ペプチド、抗体、該セマフォリンW遺伝子のアンチセンスヌクレオチド、これらの物質の医薬・診断薬あるいは研究用試薬としての用途、さらには該セマフォリンWを用いたセマフォリンWアンタゴニストのスクリーニング方法、該スクリーニング方法により得られるセマフォリンWアンタゴニスト、これらアンタゴニストを含有する医薬、若しくは該セマフォリンWについてのトランスジェニック動物等が提供される。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 4008

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列 : No

アンチセンス : No

起源

生物名 : ラット (*Rattus norvegicus*)

組織の種類 : 脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号 : 5' UTR

存在位置 : 1..75

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 76..2406

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : 3' UTR

存在位置 : 2407..3977

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : polyA signal

存在位置 : 3978..4008

特徴を決定した方法 : E

配列

GCCGAGGCCC GCGCAGTAGC GGTACTAAGT AGAGGCTGCT GGACGCGCCC CACCCGGCAC	60
CAGGCGGAGC CAGAGATGCT TGCCAGGGCC GAGCGGCCCC GCCCGGGCCC CCGGCCGCCT	120
CCGGTCTTTC CCTTCCCCGCC GCCGCTGTCG CTGCTGCTGC TGCTGGCGAT ACTAAGCGCC	180
CCGGTGTGCG GCCGCGTCCC CCGCTCAGTG CCCAGAACCT CGCTGCCCAT CTCCGAGGCT	240
GACTCCTATC TCACCCGGTT TGCAGCGTCT CATACGTACA ATTACTCTGC TCTCCTTG TG	300
GATCCTGCCT CCCACACACT TTACGTCGGT GCACGGGATA GCATCTTCGC TTTAACCCCTC	360
CCCTTCTCTG GGGAAAGACC CCGAAGGATC GACTGGATGG TACCTGAGAC TCACAGACAG	420
AACTGCAGGA AGAAAGGCAA GAAAGAGGAC GAATGTCACA ATTTTATCCA GATTCTCGCC	480
ATTGTCAATG CCTCTCACCT CCTCACGTGC GGCACCTTCG CTTTGTATCC GAAGTGCGGG	540
GTTATTGATG TGTCCAGTTT CCAGCAGGTT GAAAGACTTG AGAGCGGCCG GGGGAAATGT	600
CCTTTTGAGC CAGCTCAACG GTCAGCAGCT GTAATGGCTG GGGGCGTCCT CTACACCGCC	660
ACTGTGAAGA ACTTCCTGGG GACTGAGCCC ATCATCTCCC GAGCTGTGGG TCGAGCTGAG	720
GACTGGATTG GAACAGAGAC CTTGTCATCC TGGCTTAATG CTCCAGCCTT TGTCGCAGCT	780
ATGGTCCTGA GCCCAGCTGA GTGGGGGGAT GAAGATGGAG ACGATGAAAT CTTTTTTTTC	840
TTCACGGAGA CCTCCCGAGT GTTGGACTCC TATGAGCGCA TCAAGGTCCC AAGAGTGGCC	900
CGAGTGTGTG CGGGGGACCT TGGGGGCAGG AAGACCCTTC AGCAGAGATG GACGACGTTT	960
CTGAAGGCTG ACCTGCTGTG CCCAGGGCCC GAGCATGGCC GGGCCTCCGG GGTTCGTCAG	1020
GCTATGGCAG AGCTTCGGCC TCAGCCTGGA GCGGGAACCC CCATCTTTTA TGGGATCTTT	1080
TCCTCCAGT GGGAAAGGAGC TGCCATCTCT GCTGTGTGTG CCTCCGACC CCAAGACATC	1140
CGGGCAGTGC TGAATGGTCC CTTTAGAGAG CTAAACATG ACTGCAACAG GGGACTGCCT	1200
GTCATGGACA ACGAGGTGCC CCAGCCCAGA CCTGGAGAGT GCATCGCCAA CAACATGAAG	1260

CTCACAGCAGT TTGGATCCTC ACTCTCCCTG CCAGACCGCG TGCTCACCTT TATCAGAGAC 1320
 CACCCTCTCA TGGACAGGCC CGTGTTCCTG GCTGACGGCC GCCCCCTGCT GGTCACCTACA 1380
 GATACAGCCT ATCTCAGAGT CGTGGCCCCAC AGGGTGACCA GCCTCTCAGG GAAAGAATAT 1440
 GACGTGCTCT ACCTGGGGAC AGAGGATGGA CACCTCCACC GGGCTGTGCG CATTGGAGCT 1500
 CAGCTCAGTG TCTTGGAGGA TCTGGCCTTG TTCCAGAAC CACAGCCGGT TGAGAGCATG 1560
 AAATTGTACC ACGATTGGCT CCTGGTGGGC TCCATACTG AGGTGACACA AGTGAACACC 1620
 AGCAACTGTG GCCGTCTCCA GAGCTGCTCG GAGTGTATCC TGGCCCAGGA CCCCCTGTGC 1680
 GCCTGGAGCT TCCGGCTTGA TGCTTGTGTG GCCACGCCG GCGAGCACCG CGGGATGGTT 1740
 CAAGATATAG AGTCAGCGGA TGTCTCTTCT TTGTGTCCAA AAGAACCTGG AGAACATCCC 1800
 GTAGTGTGTTG AAGTCCGGT GGCTACTGTG GGCCACGTGG TCCTGCCATG TTCCCCCAGT 1860
 TCTGCCTGGG CATCCTGTGT GTGGCACCAG CCCAGTGGAG TGAAGCGCT CACTCCCCGG 1920
 AGGGATGGAC TAGAGGTGGT GGTGACCCCA GGGGCCATGG GGGCTTATGC TTGCGAGTGT 1980
 CAGGAGGGTG GAGCCGCCCCG CGTGGTGGCT GCTTATAGCT TGGTGTGGGG CAGCCAGCGG 2040
 GGACCCTCAA ACCGGGCCCCA CACCGTTGTG GGGGCTGGAT TGGTTGGCTT TCTCCTGGGT 2100
 GTTCTTGACAG CATCCCTCAC TCTCCTCCTG ATTGGTCGCC GTCAGCAGCG TCGGCGACAG 2160
 AGGGAGCTTC TAGCTAGAGA CAAGGTGGGC TTAGATCTGG GGGCTCCACC TTCTGGGACC 2220
 ACAAGCTATA GTCAGGACCC TCCCTCTCCT TCGCCTGAAG ATGAACGGCT GCCCCCTGGCC 2280
 CTGGGTAAAGC GGGGCAGTGG TTTTGGTGGC TTCCCTCCAC CCTTCCTGCT GGATTCTTGC 2340
 CCAAGCCCAG CCCACATCCG GCTCACTGGG GCGCCTCTAG CCACGTGTGA TGAGACCTCC 2400
 ATCTAAAGCC GGGGAAAATG ACTGCCAGCC ATGAGCAGTC TCTGGAATA GTGGCTACCA 2460
 AGACCATGAT CATGGCTGCT CCTTTCTCTT GGAGTCTGTG TGTTCACACA TTAGTGTCTG 2520
 TCCTCTGGAC CTGGACCTGG CCTTTGCCCA GATTCCTGAT TCTCATGAGA GATCAACCCT 2580
 GTAACCTTCT GCGATGGCCT CTTGTCTTGG GCCCATCAGC TTGTGGGGTG GAGTAAGGAC 2640
 ATAGGCCCCG GAAAGGGAAT CAGTGTGGAG GTAGTTGGGG CGTGTGTGCC CTGCGTCCTT 2700
 GTGGTGGCTG TATGATTTCC CAGTCTGCTG ACTCTGGGGA GCGCATGATC CCCTGACTGC 2760

CTTGAGATCT CTCCCAACTC AGTTTCCCCT TGCTCTGGAA GAGTGTGTGT CTATACACTG	2820
GTGTGCCTAG AAGGCCTGTC CATGTGTGCA TGGACGACAG GGCCGGTGCC TCGGTGCTTT	2880
TGGGGAGTCG GAGAGAAAGG TTGGAATGGG GGACAACTTA ACCCTCGGTA GCCAGTGAGG	2940
GAAACCACAT GCCCGTCCCC ATCACCCAC AGCGCTTCTT TAACTTTGAG CAAAGTTCCC	3000
AAAGTGACCT TCTGGGTGGG AAGGGCAGCA GGACATGTGG CCCCCGTCTT TCTCCTTGTC	3060
TTTCCCTTCT GGCTGCCAAC CACTGCCGTG CCACCGCTGC GCTTTCCTG GCTGGAGTGG	3120
AGGCTGAGTC CTCTGTCCTT GGTTCCTT TAAATGAAC TTCACAACAT TCTAAATATT	3180
GGGGGATGAC AAATGACTTT TTTCCCAGA AAAGTGTGTA GGAAATACAA GCAGGTAAAA	3240
GAAGATTTGC CTCAGTGA CTACCCCTTG CCCTAAAGCA GGAGTCCCTC AGCTAGCGTC	3300
TGTGGACTCC CTGAAATTGT ATGCGTCTGT GGA CTCCCTG AAATTGTATG CAAAGTGTCT	3360
GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTTTGCGTGC ATGTGTGCAT	3420
GTGTGTTTGA TGGCTTTCAT CAGATTCTCA AGGCCTTAAT GAGGTAAAG GACCACGGCC	3480
TATAGTCACC ACACTTGGGC CACATGGAGG AGGTGTTGCT CTCTGAGGCA GTTCCTCCCT	3540
GGCCTGCCTG AGGCCAGCCC CTGGACACAT TGCTGCTGGA GACCCACAT CTCTCCAGAA	3600
CTTGGAAGCT AGGCTCTGCG CGTGCTTGAA GGCACCACCA TCTCCCTTCT TGCTTCATTC	3660
TCCTGTGTGC TCTGCCTCTG CTCAGTCCTG CTCTTGGCCT GTGAATGTGC CTCGCCCCTG	3720
CCTGGTGGGG GACCTCAAAC CCCAGTGCTG ATGCTACCCT TTCCAGTGGG AGTTTCTGTT	3780
CTGCTTTCCT TGACAGCAGC CTGTGAACTA CTCACGAGTC CCCTTGGTTT GGAGTTCCCG	3840
GTGGCTTTGA GTAGGATCTT TGGCGTGGCA TCTAACCTAG CAGCATTGAT CGTTCATTGT	3900
AAAGTGGGGA TATACCTACC TCAGGGTTGC TGCAAGGATC AAACGAGGAA ACGTATAAAT	3960
AAAGCATTAC CCACAGCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	4008

配列番号 : 2

配列の長さ : 2331

配列の型 : 核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

起源

生物名：ラット (*Rattus norvegicus*)

組織の種類：脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..2331

特徴を決定した方法：E

配列

ATGCTTGCCA GGGCCGAGCG GCCCGCCCCG GGCCCCCGGC CGCCTCCGGT CTTTCCCTTC	60
CCGCCGCCGC TGTCGCTGCT GCTGCTGCTG GCGATACTAA GCGCCCCGGT GTGCGGCCGC	120
GTCCCCCGCT CAGTGCCAG AACCTCGCTG CCCATCTCCG AGGCTGACTC CTATCTCACC	180
CGGTTTGCAG CGTCTCATAC GTACAATTAC TCTGCTCTCC TTGTGGATCC TGCCTCCAC	240
ACACTTTACG TCGGTGCACG GGATAGCATC TTCGCTTTAA CCCTCCCCTT CTCTGGGGAA	300
AGACCCCGAA GGATCGACTG GATGGTACCT GAGACTCACA GACAGAACTG CAGGAAGAAA	360
GGCAAGAAAG AGGACGAATG TCACAATTTT ATCCAGATTC TCGCCATTGT CAATGCCTCT	420
CACCTCCTCA CGTGCGGCAC CTTCGCTTTT GATCCGAAGT GCGGGGTTAT TGATGTGTCC	480
AGTTTCCAGC AGGTTGAAAG ACTTGAGAGC GGCCGGGGGA AATGTCCTTT TGAGCCAGCT	540
CAACGGTCAG CAGCTGTAAT GGCTGGGGGC GTCCTCTACA CCGCCACTGT GAAGAACTTC	600
CTGGGGACTG AGCCCATCAT CTCCCGAGCT GTGGGTCGAG CTGAGGACTG GATTGGAACA	660
GAGACCTTGT CATCCTGGCT TAATGCTCCA GCCTTTGTCT CAGCTATGGT CCTGAGCCCA	720

GCTGAGTGGG GGGATGAAGA TGGAGACGAT GAAATCTTTT TTTTCTTCAC GGAGACCTCC 780
CGAGTGTTGG ACTCCTATGA GCGCATCAAG GTCCCAAGAG TGGCCCGAGT GTGTGCGGGG 840
GACCTTGGGG GCAGGAAGAC CCTTCAGCAG AGATGGACGA CGTTTCTGAA GGCTGACCTG 900
CTGTGCCCAG GGCCCGAGCA TGGCCGGGCC TCCGGGGTTC TGCAGGCTAT GGCAGAGCTT 960
CGGCCTCAGC CTGGAGCGGG AACCCCATC TTTTATGGGA TCTTTTCCTC CCAGTGGGAA 1020
GGAGCTGCCA TCTCTGCTGT GTGTGCCTTC CGACCCCAAG ACATCCGGGC AGTGCTGAAT 1080
GGTCCCTTTA GAGAGCTAAA ACATGACTGC AACAGGGGAC TGCCTGTCAT GGACAACGAG 1140
GTGCCCCAGC CCAGACCTGG AGAGTGCATC GCCAACAACA TGAAGCTCCA GCAGTTTGGA 1200
TCCTCACTCT CCCTGCCAGA CCGCGTGCTC ACCTTTATCA GAGACCACCC TCTCATGGAC 1260
AGGCCCGTGT TCCCGGCTGA CGGCCGCCCC CTGCTGGTCA CTACAGATAC AGCCTATCTC 1320
AGAGTCGTGG CCCACAGGGT GACCAGCCTC TCAGGGAAAG AATATGACGT GCTCTACCTG 1380
GGGACAGAGG ATGGACACCT CCACCGGGCT GTGCGCATTG GAGCTCAGCT CAGTGTCTTG 1440
GAGGATCTGG CCTTGTTCCC AGAACCACAG CCGGTTGAGA GCATGAAATT GTACCACGAT 1500
TGGCTCCTGG TGGGCTCCCA TACTGAGGTG ACACAAGTGA ACACCAGCAA CTGTGGCCGT 1560
CTCCAGAGCT GCTCGGAGTG TATCCTGGCC CAGGACCCCG TGTGCGCCTG GAGCTTCCGG 1620
CTTGATGCTT GTGTGGCCCA CGCCGGCGAG CACCGCGGGA TGGTTCAAGA TATAGAGTCA 1680
GCGGATGTCT CTTCTTTGTG TCCAAAAGAA CCTGGAGAAC ATCCCGTAGT GTTTGAAGTT 1740
CCGGTGGCTA CTGTGGGCCA CGTGGTCCTG CCATGTTCCC CCAGTTCTGC CTGGGCATCC 1800
TGTGTGTGGC ACCAGCCCAG TGGAGTGA CT GCGCTCACTC CCCGGAGGGA TGGACTAGAG 1860
GTGGTGGTGA CCCCAGGGGC CATGGGGGCT TATGCTTGCG AGTGT CAGGA GGGTGGAGCC 1920
GCCCCGCTGG TGGCTGCTTA TAGCTTGGTG TGGGGCAGCC AGCGGGGACC CTCAAACCGG 1980
GCCACACCG TTGTGGGGGC TGGATTGGTT GGCTTTCTCC TGGGTGTTCT TGCAGCATCC 2040
CTCACTCTCC TCCTGATTGG TCGCCGTCAG CAGCGTCGGC GACAGAGGGA GCTTCTAGCT 2100
AGAGACAAGG TGGGCTTAGA TCTGGGGGCT CCACCTTCTG GGACCACAAG CTATAGTCAG 2160
GACCCTCCCT CTCCTTCGCC TGAAGATGAA CGGCTGCCCC TGGCCCTGGG TAAGCGGGGC 2220

AGTGGTTTTG GTGGCTTCCC TCCACCTTC CTGCTGGATT CTTGCCCAAG CCCAGCCCAC 2280
ATCCGGCTCA CTGGGGCGCC TCTAGCCACG TGTGATGAGA CCTCCATCTA A 2331

配列番号 : 3

配列の長さ : 776

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

起源

生物名 : ラット (*Rattus norvegicus*)

組織の種類 : 脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号 : peptide

存在位置 : 1..776

特徴を決定した方法 : P

配列

Met Leu Ala Arg Ala Glu Arg Pro Arg Pro Gly Pro Arg Pro Pro Pro
1 5 10 15
Val Phe Pro Phe Pro Pro Pro Leu Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ile
20 25 30
Leu Ser Ala Pro Val Cys Gly Arg Val Pro Arg Ser Val Pro Arg Thr
35 40 45
Ser Leu Pro Ile Ser Glu Ala Asp Ser Tyr Leu Thr Arg Phe Ala Ala
50 55 60
Ser His Thr Tyr Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Val Asp Pro Ala Ser His

65	70	75	80												
Thr	Leu	Tyr	Val	Gly	Ala	Arg	Asp	Ser	Ile	Phe	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro
	85		90		95										
Phe	Ser	Gly	Glu	Arg	Pro	Arg	Arg	Ile	Asp	Trp	Met	Val	Pro	Glu	Thr
	100		105		110										
His	Arg	Gln	Asn	Cys	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Cys	His
	115		120		125										
Asn	Phe	Ile	Gln	Ile	Leu	Ala	Ile	Val	Asn	Ala	Ser	His	Leu	Leu	Thr
	130		135		140										
Cys	Gly	Thr	Phe	Ala	Phe	Asp	Pro	Lys	Cys	Gly	Val	Ile	Asp	Val	Ser
145		150		155		160									
Ser	Phe	Gln	Gln	Val	Glu	Arg	Leu	Glu	Ser	Gly	Arg	Gly	Lys	Cys	Pro
	165		170		175										
Phe	Glu	Pro	Ala	Gln	Arg	Ser	Ala	Ala	Val	Met	Ala	Gly	Gly	Val	Leu
	180		185		190										
Tyr	Thr	Ala	Thr	Val	Lys	Asn	Phe	Leu	Gly	Thr	Glu	Pro	Ile	Ile	Ser
	195		200		205										
Arg	Ala	Val	Gly	Arg	Ala	Glu	Asp	Trp	Ile	Arg	Thr	Glu	Thr	Leu	Ser
	210		215		220										
Ser	Trp	Leu	Asn	Ala	Pro	Ala	Phe	Val	Ala	Ala	Met	Val	Leu	Ser	Pro
225		230		235		240									
Ala	Glu	Trp	Gly	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Asp	Glu	Ile	Phe	Phe	Phe	Phe
	245		250		255										
Thr	Glu	Thr	Ser	Arg	Val	Leu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Arg	Ile	Lys	Val	Pro
	260		265		270										

Arg Val Ala Arg Val Cys Ala Gly Asp Leu Gly Gly Arg Lys Thr Leu
275 280 285

Gln Gln Arg Trp Thr Thr Phe Leu Lys Ala Asp Leu Leu Cys Pro Gly
290 295 300

Pro Glu His Gly Arg Ala Ser Gly Val Leu Gln Ala Met Ala Glu Leu
305 310 315 320

Arg Pro Gln Pro Gly Ala Gly Thr Pro Ile Phe Tyr Gly Ile Phe Ser
325 330 335

Ser Gln Trp Glu Gly Ala Ala Ile Ser Ala Val Cys Ala Phe Arg Pro
340 345 350

Gln Asp Ile Arg Ala Val Leu Asn Gly Pro Phe Arg Glu Leu Lys His
355 360 365

Asp Cys Asn Arg Gly Leu Pro Val Met Asp Asn Glu Val Pro Gln Pro
370 375 380

Arg Pro Gly Glu Cys Ile Ala Asn Asn Met Lys Leu Gln Gln Phe Gly
385 390 395 400

Ser Ser Leu Ser Leu Pro Asp Arg Val Leu Thr Phe Ile Arg Asp His
405 410 415

Pro Leu Met Asp Arg Pro Val Phe Pro Ala Asp Gly Arg Pro Leu Leu
420 425 430

Val Thr Thr Asp Thr Ala Tyr Leu Arg Val Val Ala His Arg Val Thr
435 440 445

Ser Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Asp Val Leu Tyr Leu Gly Thr Glu Asp
450 455 460

Gly His Leu His Arg Ala Val Arg Ile Gly Ala Gln Leu Ser Val Leu

465	470	475	480
Glu Asp Leu Ala Leu Phe Pro Glu Pro Gln Pro Val Glu Ser Met Lys			
	485	490	495
Leu Tyr His Asp Trp Leu Leu Val Gly Ser His Thr Glu Val Thr Gln			
	500	505	510
Val Asn Thr Ser Asn Cys Gly Arg Leu Gln Ser Cys Ser Glu Cys Ile			
	515	520	525
Leu Ala Gln Asp Pro Val Cys Ala Trp Ser Phe Arg Leu Asp Ala Cys			
	530	535	540
Val Ala His Ala Gly Glu His Arg Gly Met Val Gln Asp Ile Glu Ser			
545	550	555	560
Ala Asp Val Ser Ser Leu Cys Pro Lys Glu Pro Gly Glu His Pro Val			
	565	570	575
Val Phe Glu Val Pro Val Ala Thr Val Gly His Val Val Leu Pro Cys			
	580	585	590
Ser Pro Ser Ser Ala Trp Ala Ser Cys Val Trp His Gln Pro Ser Gly			
	595	600	605
Val Thr Ala Leu Thr Pro Arg Arg Asp Gly Leu Glu Val Val Val Thr			
	610	615	620
Pro Gly Ala Met Gly Ala Tyr Ala Cys Glu Cys Gln Glu Gly Gly Ala			
625	630	635	640
Ala Arg Val Val Ala Ala Tyr Ser Leu Val Trp Gly Ser Gln Arg Gly			
	645	650	655
Pro Ser Asn Arg Ala His Thr Val Val Gly Ala Gly Leu Val Gly Phe			
	660	665	670

Leu Leu Gly Val Leu Ala Ala Ser Leu Thr Leu Leu Leu Ile Gly Arg
675 680 685
Arg Gln Gln Arg Arg Arg Gln Arg Glu Leu Leu Ala Arg Asp Lys Val
690 695 700
Gly Leu Asp Leu Gly Ala Pro Pro Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Ser Gln
705 710 715 720
Asp Pro Pro Ser Pro Ser Pro Glu Asp Glu Arg Leu Pro Leu Ala Leu
725 730 735
Gly Lys Arg Gly Ser Gly Phe Gly Gly Phe Pro Pro Pro Phe Leu Leu
740 745 750
Asp Ser Cys Pro Ser Pro Ala His Ile Arg Leu Thr Gly Ala Pro Leu
755 760 765
Ala Thr Cys Asp Glu Thr Ser Ile
770 775

配列番号 : 4

配列の長さ : 2315

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列 : No

アンチセンス : No

起源

生物名 : ヒト (Homo sapiens)

組織の種類：脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..1764

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：3' UTR

存在位置：1765..2315

特徴を決定した方法：E

配列

GGGGGTGTCC TCTATGCTGC CACTGTGAAA AACTACCTGG GGACGGAGCC AATTATCACC	60
AGAGCAGTGG GTCGTGCCGA GGA CTGGATT CGGACAGATA CCTTGCCTTC CTGGCTGAAC	120
GCCCCAGCCT TTGTCGCAGC CGTGGCCTTG AGCCCAGCCG AATGGGGGGA TGAAGATGGA	180
GACGACGAAA TCTACTTCTT CTTTACGGAG ACTTCCCGAG CATTTGACTC ATACGAGCGC	240
ATTAAAGTCC CACGGGTGGC CCGTGTGTGT GCGGGGGACC TCGGGGGCCG GAAGACCCTC	300
CAGCAGAGAT GGACGACGTT TTTGAAAGCT GACCTGCTCT GTCCAGGGCC TGAGCATGGC	360
CGGGCCTCCA GTGTCTGCA GGATGTTGCT GTGCTTCGAC CTGAGCTTGG GGCAGGGACT	420
CCCATCTTTT ATGGCATCTT TTCTTCCCAG TGGGAGGGGG CTACTATCTC TGCTGTCTGT	480
GCCTTCCGAC CACAAGACAT TCGGACAGTG CTGAATGGTC CCTTCAGAGA ACTAAAACAT	540
GACTGCAACA GAGGACTGCC TGTCGTGGAC AATGATGTGC CCCAGCCCAG ACCTGGAGAG	600
TGCATACCA ACAACATGAA GCTCCGGCAC TTTGGTCAT CTCTCTCCCT GCCTGACCGC	660
GTACTCACCT TCATCCGGGA CCACCCACTC ATGGACAGGC CAGTGTTTCC AGCTGATGGC	720
CACCCCCTGC TGGTCACTAC AGATACAGCC TATCTCAGAG TCGTGGCCCA CAGGGTGACC	780
AGCCTCTCAG GGAAAGAGTA TGATGTGCTC TACCTGGGGA CAGAGGATGG ACACCTCCAC	840
CGAGCAGTGC GGATCGGAGC TCAGCTCAGC GTTCTTGAAG ATCTGGCCTT ATTCCCAGAG	900

CCACAGCCAG TTGAGAACAT GAAATTGTAC CACAGCTGGC TCCTGGTTGG CTCCCGTACT 960
 GAGGTGACAC AAGTGAATAC AACCAACTGT GGCCGTCTCC AGAGCTGCTC AGAGTGCATC 1020
 CTGGCCCAGG ACCCAGTCTG TGCCTGGAGC TTCCGGCTGG ATGAGTGTGT GGCCCATGCC 1080
 GGGGAGCACC GAGGGTTGGT CCAAGACATA GAGTCAGCAG ATGTCTCCTC TTTGTGTCCT 1140
 AAAGAGCCTG GAGAACGTCC AGTAGTGTTC GAAGTTCCCG TGGCTACAGC TGCGCATGTG 1200
 GTCTTGCCAT GTTCTCCAAG CTCAGCATGG GCATCCTGTG TGTGGCACCA GCCCAGTGGA 1260
 GTGACTGCAC TCACCCCCCG GCGGGATGGA CTGGAGGTGG TGGTGACCCC AGGGGCCATG 1320
 GGCCTTATG CCTGTGAATG TCAGGAGGGT GGGGCAGCCC ATGTGGTAGC AGCTTACAGC 1380
 TTGGTATGGG GCAGCCAGCG AGATGCTCCG AGCCGGGCCC ACACAGTGGG GGCGGGACTG 1440
 GCTGGCTTCT TCTTGGGGAT TCTCGCAGCA TCCCTGACTC TCATTCTGAT TGGTCGGCGT 1500
 CAGCAGCGAC GCGACAGAG GGAACCTCTG GCTAGAGACA AGGTGGGCCT GGACCTGGGG 1560
 GCTCCACCTT CTGGGACCAC AAGCTACAGC CAAGACCCTC CCTCCCCCTC TCCTGAAGAT 1620
 GAGCGGTTGC CGCTGGCCCT GGCCAAGAGG GGCAGTGGCT TTGGTGGATT CTCACCACCC 1680
 TTCCTGCTTG ATCCTTGCCC AAGCCCAGCC CACATTCGGC TAACTGGGGC TCCTCTAGCC 1740
 ACATGTGATG AAACATCCAT CTAGAGCTGG GCAAATGACC ACTAGTGTAT AAGTGATCAC 1800
 TGGAACGGAG TGACCACTGA GATGCTGGGG GTCAGTGGGC CTGGAAGACC ATCCAGCCT 1860
 CTGAGTTCTC TTTGAGTATG AGTGATTACT TGGATTTTAG TATCTGTTCT CTCTGAGCCT 1920
 GGATGGGCTT GGGGCCAGAC CTTGCTGA TTCCTGATTC CCATGAGAAA TCAGAACTGC 1980
 TTTCTGCAGC AAATCAGGGC TTCCCCCTAA CATCTGAACT CCTGTAAACC TTCATCCCTG 2040
 GCCCCCTATC TTGGGCCCAT TAGTTTGGG GATGGGGCAC AGGGCATAGC TATGACTTTG 2100
 CTTTCTGGTT GGAGCCTGGC CGGAAGGAAG AGCCCTGGAG GTGGTTGGGG GCAAATGTGC 2160
 CCTGAGTCCT TGGGGTGGTT CTGCTTATTC TTCAAGTTTA TCTGAATCTG TGGGGAGTGC 2220
 ATGATCCCA TGTGCAATA TGGAGTCTCT GCCCTGAGAT CTTCCCCATC TCAGTTTCC 2280
 TTCCATGAAA GAGTACGTGT AAATACATAG TGTTTC 2315

配列番号 : 5

配列の長さ : 1761

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列 : No

アンチセンス : No

起源

生物名 : ヒト (Homo sapiens)

組織の種類 : 脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1..1761

特徴を決定した方法 : E

配列

GGGGGTGTCC TCTATGCTGC CACTGTGAAA AACTACCTGG GGACGGAGCC AATTATCACC	60
AGAGCAGTGG GTCGTGCCGA GGA CTGGATT CGGACAGATA CCTTGCCTTC CTGGCTGAAC	120
GCCCCAGCCT TTGTCGCAGC CGTGGCCTTG AGCCCAGCCG AATGGGGGGA TGAAGATGGA	180
GACGACGAAA TCTACTTCTT CTTTACGGAG ACTTCCCGAG CATTTGACTC ATACGAGCGC	240
ATTAAAGTCC CACGGGTGGC CCGTGTGTGT GCGGGGGACC TCGGGGGCCG GAAGACCCTC	300
CAGCAGAGAT GGACGACGTT TTTGAAAGCT GACCTGCTCT GTCCAGGGCC TGAGCATGGC	360
CGGGCCTCCA GTGTCCTGCA GGATGTTGCT GTGCTTCGAC CTGAGCTTGG GGCAGGGACT	420
CCCATCTTTT ATGGCATCTT TTCTTCCCAG TGGGAGGGGG CTACTATCTC TGCTGTCTGT	480
GCCTTCCGAC CACAAGACAT TCGGACAGTG CTGAATGGTC CCTTCAGAGA ACTAAAACAT	540

GACTGCAACA GAGGACTGCC TGTCGTGGAC AATGATGTGC CCCAGCCCAG ACCTGGAGAG 600
 TGCATCACCA ACAACATGAA GCTCCGGCAC TTTGGCTCAT CTCTCTCCCT GCCTGACCGC 660
 GTACTCACCT TCATCCGGGA CCACCCACTC ATGGACAGGC CAGTGTTTCC AGCTGATGGC 720
 CACCCCTGC TGGTCACTAC AGATACAGCC TATCTCAGAG TCGTGGCCCA CAGGGTGACC 780
 AGCCTCTCAG GGAAAGAGTA TGATGTGCTC TACCTGGGGA CAGAGGATGG ACACCTCCAC 840
 CGAGCAGTGC GGATCGGAGC TCAGCTCAGC GTTCTTGAAG ATCTGGCCTT ATTCCAGAG 900
 CCACAGCCAG TTGAGAACAT GAAATTGTAC CACAGCTGGC TCCTGGTTGG CTCCCGTACT 960
 GAGGTGACAC AAGTGAATAC AACCAACTGT GGCCGTCTCC AGAGCTGCTC AGAGTGCATC 1020
 CTGGCCCAGG ACCCAGTCTG TGCCTGGAGC TTCCGGCTGG ATGAGTGTGT GGCCCATGCC 1080
 GGGGAGCACC GAGGGTTGGT CCAAGACATA GAGTCAGCAG ATGTCTCCTC TTTGTGTCCT 1140
 AAAGAGCCTG GAGAACGTCC AGTAGTGTTT GAAGTTCCCG TGGCTACAGC TGCGCATGTG 1200
 GTCTTGCCAT GTTCTCCAAG CTCAGCATGG GCATCCTGTG TGTGGCACCA GCCCAGTGGA 1260
 GTGACTGCAC TCACCCCCCG GCGGGATGGA CTGGAGGTGG TGGTGACCCC AGGGGCCATG 1320
 GGGCCTTATG CCTGTGAATG TCAGGAGGGT GGGGCAGCCC ATGTGGTAGC AGCTTACAGC 1380
 TTGGTATGGG GCAGCCAGCG AGATGCTCCG AGCCGGGCCC ACACAGTGGG GGCGGGACTG 1440
 GCTGGCTTCT TCTTGGGGAT TCTCGCAGCA TCCCTGACTC TCATTCTGAT TGGTCGGCGT 1500
 CAGCAGCGAC GGCACAGAG GGAACCTCTG GCTAGAGACA AGGTGGGCCT GGACCTGGGG 1560
 GCTCCACCTT CTGGGACCAC AAGCTACAGC CAAGACCCTC CCTCCCCCTC TCCTGAAGAT 1620
 GAGCGGTTGC CGCTGGCCCT GGCCAAGAGG GGCAGTGGCT TTGGTGGATT CTCACCACCC 1680
 TTCCTGCTTG ATCCTTGCCC AAGCCCAGCC CACATTCGGC TAACTGGGGC TCCTCTAGCC 1740
 ACATGTGATG AAACATCCAT C 1761

配列番号 : 6

配列の長さ : 587

配列の型 : アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

組織の種類：脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1..587

特徴を決定した方法：P

配列

Gly	Gly	Val	Leu	Tyr	Ala	Ala	Thr	Val	Lys	Asn	Tyr	Leu	Gly	Thr	Glu	
Pro	Ile	Ile	Thr	Arg	Ala	Val	Gly	Arg	Ala	Glu	Asp	Trp	Ile	Arg	Thr	
Asp	Thr	Leu	Pro	Ser	Trp	Leu	Asn	Ala	Pro	Ala	Phe	Val	Ala	Ala	Val	
Ala	Leu	Ser	Pro	Ala	Glu	Trp	Gly	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Asp	Glu	Ile	
Tyr	Phe	Phe	Phe	Thr	Glu	Thr	Ser	Arg	Ala	Phe	Asp	Ser	Tyr	Glu	Arg	
Ile	Lys	Val	Pro	Arg	Val	Ala	Arg	Val	Cys	Ala	Gly	Asp	Leu	Gly	Gly	
Arg	Lys	Thr	Leu	Gln	Gln	Arg	Trp	Thr	Thr	Phe	Leu	Lys	Ala	Asp	Leu	
Leu	Cys	Pro	Gly	Pro	Glu	His	Gly	Arg	Ala	Ser	Ser	Val	Leu	Gln	Asp	

115 120 125
Val Ala Val Leu Arg Pro Glu Leu Gly Ala Gly Thr Pro Ile Phe Tyr
130 135 140
Gly Ile Phe Ser Ser Gln Trp Glu Gly Ala Thr Ile Ser Ala Val Cys
145 150 155 160
Ala Phe Arg Pro Gln Asp Ile Arg Thr Val Leu Asn Gly Pro Phe Arg
165 170 175
Glu Leu Lys His Asp Cys Asn Arg Gly Leu Pro Val Val Asp Asn Asp
180 185 190
Val Pro Gln Pro Arg Pro Gly Glu Cys Ile Thr Asn Asn Met Lys Leu
195 200 205
Arg His Phe Gly Ser Ser Leu Ser Leu Pro Asp Arg Val Leu Thr Phe
210 215 220
Ile Arg Asp His Pro Leu Met Asp Arg Pro Val Phe Pro Ala Asp Gly
225 230 235 240
His Pro Leu Leu Val Thr Thr Asp Thr Ala Tyr Leu Arg Val Val Ala
245 250 255
His Arg Val Thr Ser Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Asp Val Leu Tyr Leu
260 265 270
Gly Thr Glu Asp Gly His Leu His Arg Ala Val Arg Ile Gly Ala Gln
275 280 285
Leu Ser Val Leu Glu Asp Leu Ala Leu Phe Pro Glu Pro Gln Pro Val
290 295 300
Glu Asn Met Lys Leu Tyr His Ser Trp Leu Leu Val Gly Ser Arg Thr
305 310 315 320

Glu Val Thr Gln Val Asn Thr Thr Asn Cys Gly Arg Leu Gln Ser Cys
 325 330 335
 Ser Glu Cys Ile Leu Ala Gln Asp Pro Val Cys Ala Trp Ser Phe Arg
 340 345 350
 Leu Asp Glu Cys Val Ala His Ala Gly Glu His Arg Gly Leu Val Gln
 355 360 365
 Asp Ile Glu Ser Ala Asp Val Ser Ser Leu Cys Pro Lys Glu Pro Gly
 370 375 380
 Glu Arg Pro Val Val Phe Glu Val Pro Val Ala Thr Ala Ala His Val
 385 390 395 400
 Val Leu Pro Cys Ser Pro Ser Ser Ala Trp Ala Ser Cys Val Trp His
 405 410 415
 Gln Pro Ser Gly Val Thr Ala Leu Thr Pro Arg Arg Asp Gly Leu Glu
 420 425 430
 Val Val Val Thr Pro Gly Ala Met Gly Ala Tyr Ala Cys Glu Cys Gln
 435 440 445
 Glu Gly Gly Ala Ala His Val Val Ala Ala Tyr Ser Leu Val Trp Gly
 450 455 460
 Ser Gln Arg Asp Ala Pro Ser Arg Ala His Thr Val Gly Ala Gly Leu
 465 470 475 480
 Ala Gly Phe Phe Leu Gly Ile Leu Ala Ala Ser Leu Thr Leu Ile Leu
 485 490 495
 Ile Gly Arg Arg Gln Gln Arg Arg Arg Gln Arg Glu Leu Leu Ala Arg
 500 505 510
 Asp Lys Val Gly Leu Asp Leu Gly Ala Pro Pro Ser Gly Thr Thr Ser

515 520 525
Tyr Ser Gln Asp Pro Pro Ser Pro Ser Pro Glu Asp Glu Arg Leu Pro
530 535 540
Leu Ala Leu Ala Lys Arg Gly Ser Gly Phe Gly Gly Phe Ser Pro Pro
545 550 555 560
Phe Leu Leu Asp Pro Cys Pro Ser Pro Ala His Ile Arg Leu Thr Gly
565 570 575
Ala Pro Leu Ala Thr Cys Asp Glu Thr Ser Ile
580 585

配列番号 : 7

配列の長さ : 196

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列 : No

アンチセンス : No

起源

生物名 : ヒト (Homo sapiens)

組織の種類 : 脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1..196

特徴を決定した方法 : E

配列

AAATTGTACC ACAGCTGGCT OCTGGTTGGC TCCCGTACTG AGGTGACACA AGTGAATACA 60
ACCAACTGTG GCCGTCTCCA GAGCTGCTCA GAGTGCATCC TGGCCCAGGA CCCAGTCTGT 120
GCCTGGAGCT TCCGGCTGGA TGAGTGTGTG GCCCATGCCG GGGAGCACCG AGGGTTGGTC 180
CAAGACATAG AGTCAG 196

配列番号 : 8

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列 : No

アンチセンス : No

配列

GATAAGGATC CGGGTCGCCG TCAGCAGCGT 30

配列番号 : 9

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列 : No

アンチセンス : yes

配列

GGCTGGAATT CATTTTCCCC GGCTTTA

27

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 333

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列 : No

アンチセンス : No

起源

生物名 : ヒト (Homo sapiens)

組織の種類 : 脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1..333

特徴を決定した方法 : E

配列

CCCCGGCCGG GTCCCGGGCA GCCTACAGCC TCGCCCTTCC CGCTACTGCT GCTGGCGGTG	60
CTGAGCGGCC CGGTATCCGG CCGCGTCCCC CGCTCGGTGC CCAGAACCTC GCTTCCAATC	120
TCTGAGGCTG ACTTCTGTCT CACCCGGTTC GCAGTCCCTC ACACATACAA TTACTCTGTT	180
CTCCTTGTGG ATCCTGCCTC CCACACACTT TATGTTGGCG CCCGGGACAC CATCTTCGCT	240
TTATCCCTGC CCTTCTCAGG GGAGAGACCC CGCAGGATTG ACTGGATGGT TCCTGAGGCT	300
CACAGACAGA ACTGTAGGAA GAAAGGCAAG AAA	333

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 111

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

起源

生物名 : ヒト (Homo sapiens)

組織の種類 : 脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号 : peptide

存在位置 : 1..111

特徴を決定した方法 : P

配列

Pro Arg Pro Gly Pro Gly Gln Pro Thr Ala Ser Pro Phe Pro Leu Leu

5

10

15

Leu Leu Ala Val Leu Ser Gly Pro Val Ser Gly Arg Val Pro Arg Ser

20

25

30

Val Pro Arg Thr Ser Leu Pro Ile Ser Glu Ala Asp Phe Cys Leu Thr

35

40

45

Arg Phe Ala Val Pro His Thr Tyr Asn Tyr Ser Val Leu Leu Val Asp

50

55

60

Pro Ala Ser His Thr Leu Tyr Val Gly Ala Arg Asp Thr Ile Phe Ala

65

70

75

80

Leu Ser Leu Pro Phe Ser Gly Glu Arg Pro Arg Arg Ile Asp Trp Met

				85					90					95
Val	Pro	Glu	Ala	His	Arg	Gln	Asn	Cys	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys	Lys
				100					105					110

請 求 の 範 囲

1. 以下の（a）又は（b）のタンパク質をコードする遺伝子：

（a）配列番号：3に記載のアミノ酸配列からなるセマフォリンWタンパク質

（b）配列番号：3に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経の伸長に対して抑制的に作用するタンパク質。

2. 以下の（c）、（d）又は（e）のDNAからなる遺伝子：

（c）配列番号：1又は配列番号：2に記載の塩基配列からなるセマフォリンWDNA

（d）配列番号：1又は配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ神経の伸長に対して抑制的に作用するタンパク質をコードするDNA

（e）前記（d）に記載のDNAであって、かつ配列番号：4又は配列番号：5に記載の塩基配列、及び／又は配列番号：10に記載の塩基配列を含有するDNA。

3. 配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセマフォリンドメインを有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子。

4. 請求項1～請求項3のいずれか記載の遺伝子を発現することによって得られるタンパク質。

5. 配列番号：3に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経の伸長に対して促進的に作用するタンパク質をコードする遺伝子。

6. 請求項5記載の遺伝子を発現することによって得られるタンパク質。
7. ヒトcDNAライブラリー又はヒトゲノムライブラリーからクローニングされるDNAであって、配列番号：1、配列番号：4又は配列番号：10に記載の塩基配列からなるDNAの少なくとも一部からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。
8. 請求項1～請求項3又は請求項5記載の遺伝子、あるいは請求項7記載のDNAのいずれかを発現する発現プラスミド。
9. 請求項8記載の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体。
10. 請求項9記載の形質転換体を培養し、発現される組換えタンパク質を回収することからなる、組換えタンパク質の生産方法。
11. 請求項4又は請求項6記載のタンパク質の、少なくとも6アミノ酸以上の部分よりなるペプチド。
12. 神経の伸長に対して促進的に作用する、請求項11記載のペプチド。
13. 配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第204位のグルタミン酸、あるいは該グルタミン酸の位置に相当するアミノ酸を含有することを特徴とする、請求項11記載のペプチド。
14. 請求項1～請求項3のいずれか記載の遺伝子、あるいは請求項7記載のDNAの、少なくとも8塩基以上の部分に対応するアンチセンスヌクレオチド、あるいはその化学的修飾体。
15. 請求項4記載のタンパク質の発現を抑制することを特徴とする、請求項14記載のアンチセンスヌクレオチド、あるいはその化学的修飾体。
16. 請求項4又は請求項6記載のタンパク質、あるいは請求項11～13いずれか記載のペプチドに対する抗体。
17. 請求項1～請求項3又は請求項5記載の遺伝子、請求項7記載の

DNA、請求項4又は請求項6記載のタンパク質、請求項11～13記載のペプチド、請求項14又は請求項15記載のアンチセンスヌクレオチド又はその化学的修飾体、あるいは請求項16記載の抗体の、いずれかを有効成分として含有する医薬。

18. 請求項4記載のタンパク質を用いることを特徴とする、セマフォリンWアンタゴニストのスクリーニング方法。

19. 請求項18記載のスクリーニング方法を用いて得られる、セマフォリンWアンタゴニスト。

20. 請求項6記載のタンパク質、請求項11～請求項13いずれか記載のペプチド、又は請求項16記載の抗体よりなる、請求項19記載のセマフォリンWアンタゴニスト。

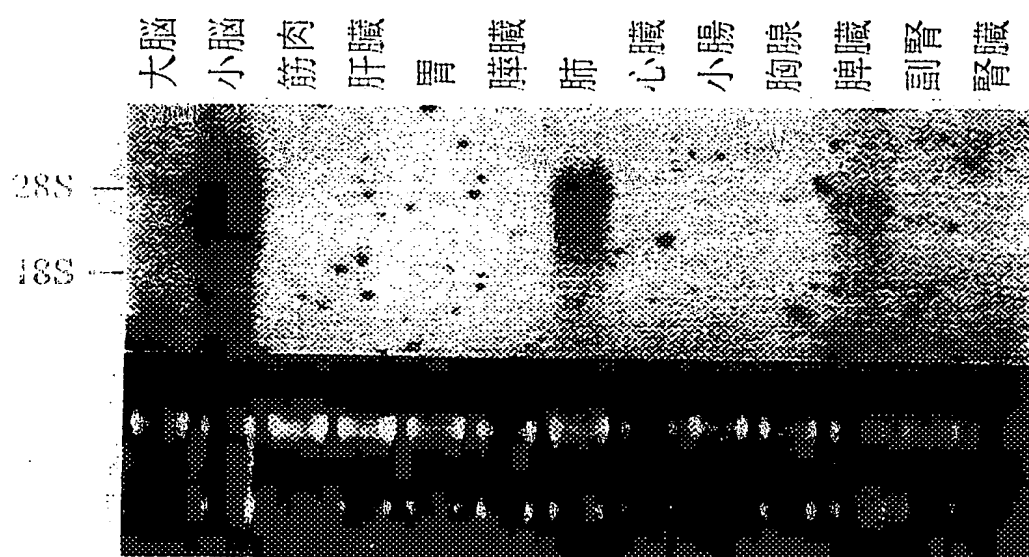
21. 請求項14又は請求項15記載のアンチセンスヌクレオチドあるいはその化学的修飾体、請求項19又は請求項20記載のセマフォリンWアンタゴニストの、少なくとも一つを含有することを特徴とする、中枢神経の再生促進剤。

22. 請求項4記載のタンパク質の少なくとも一つを含有することを特徴とする、末梢神経の伸長抑制剤。

23. 請求項1～請求項3又は請求項5記載の遺伝子、あるいは請求項7記載のDNAのいずれかを人為的に染色体中に挿入したか、あるいはいずれかをノックアウトさせたトランスジェニック動物。

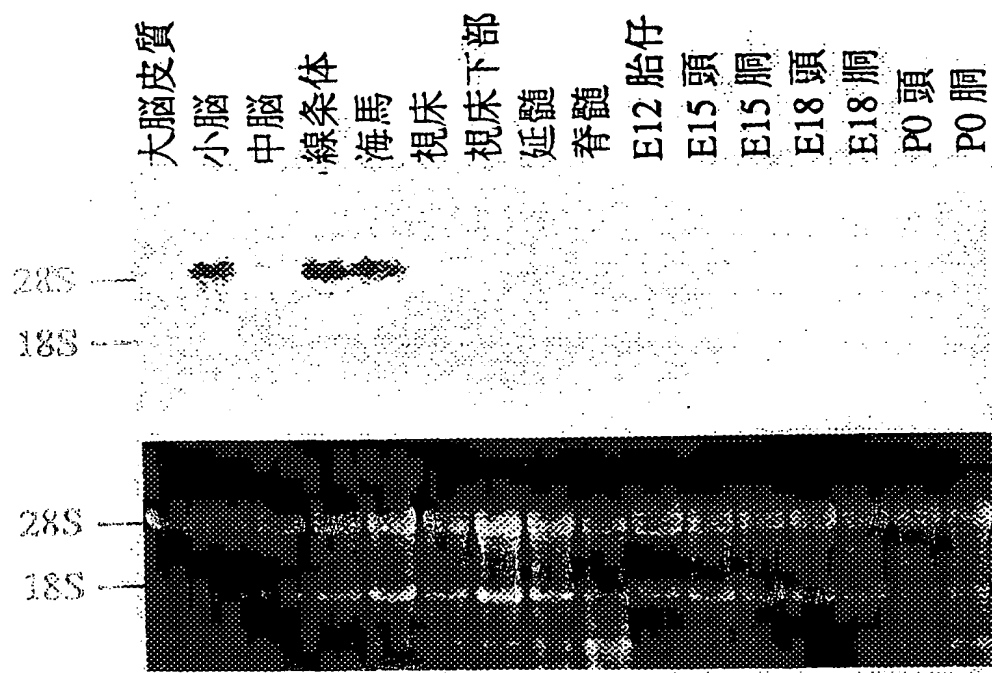
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 1



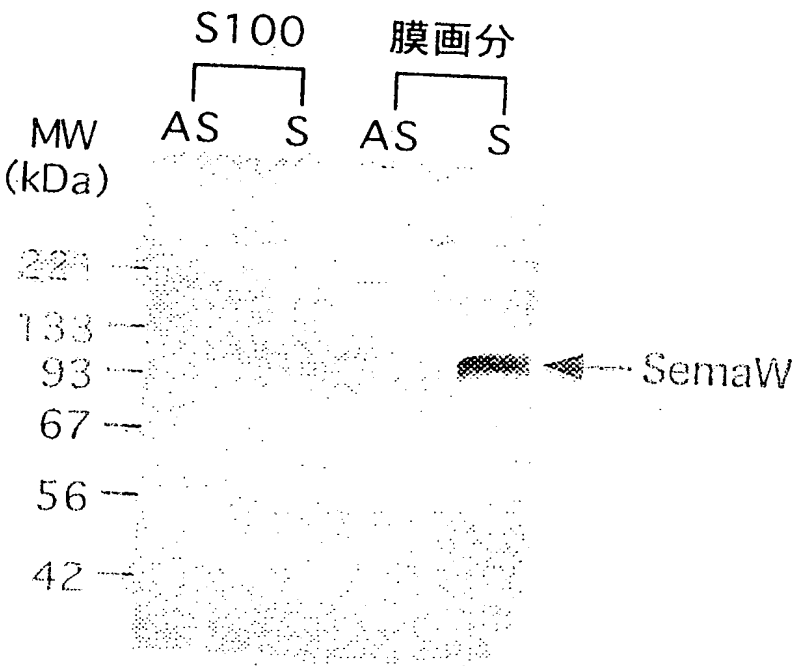
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 2



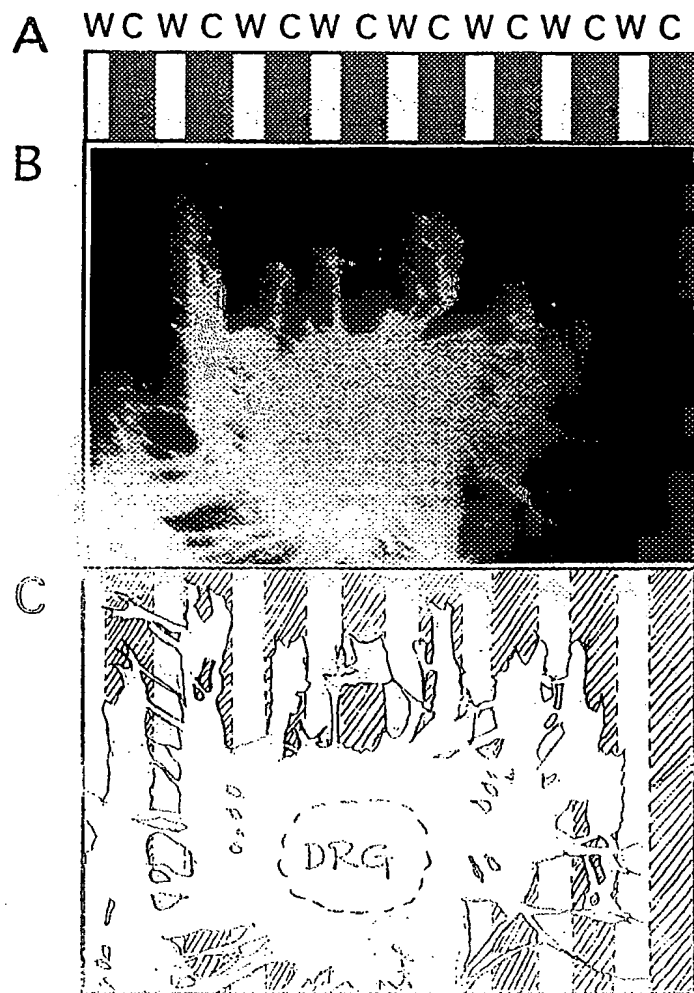
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 3



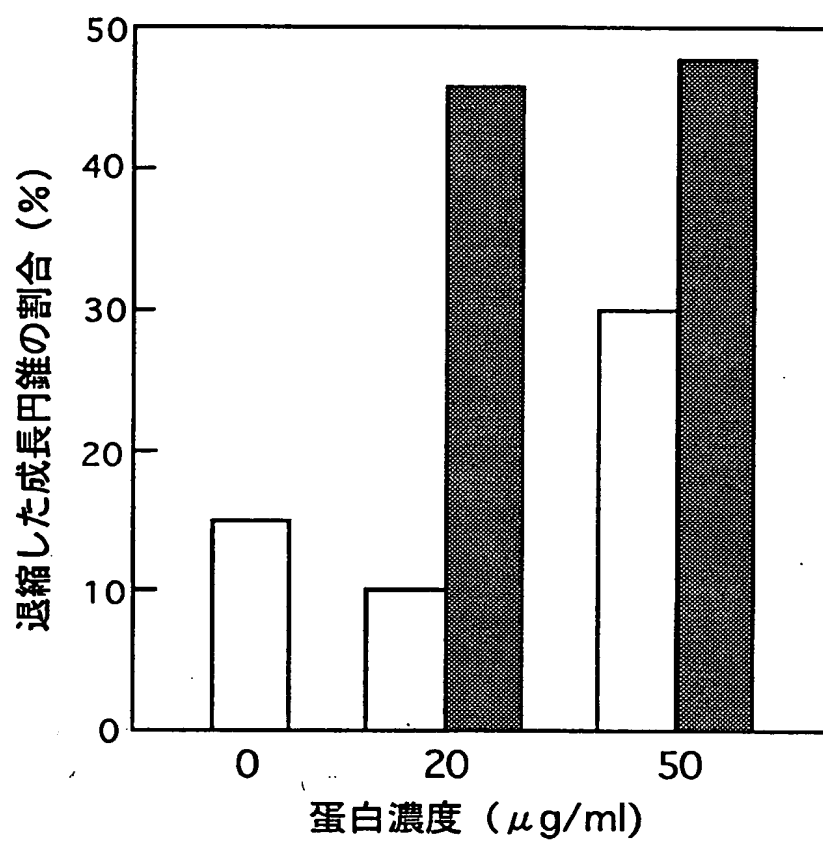
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 4



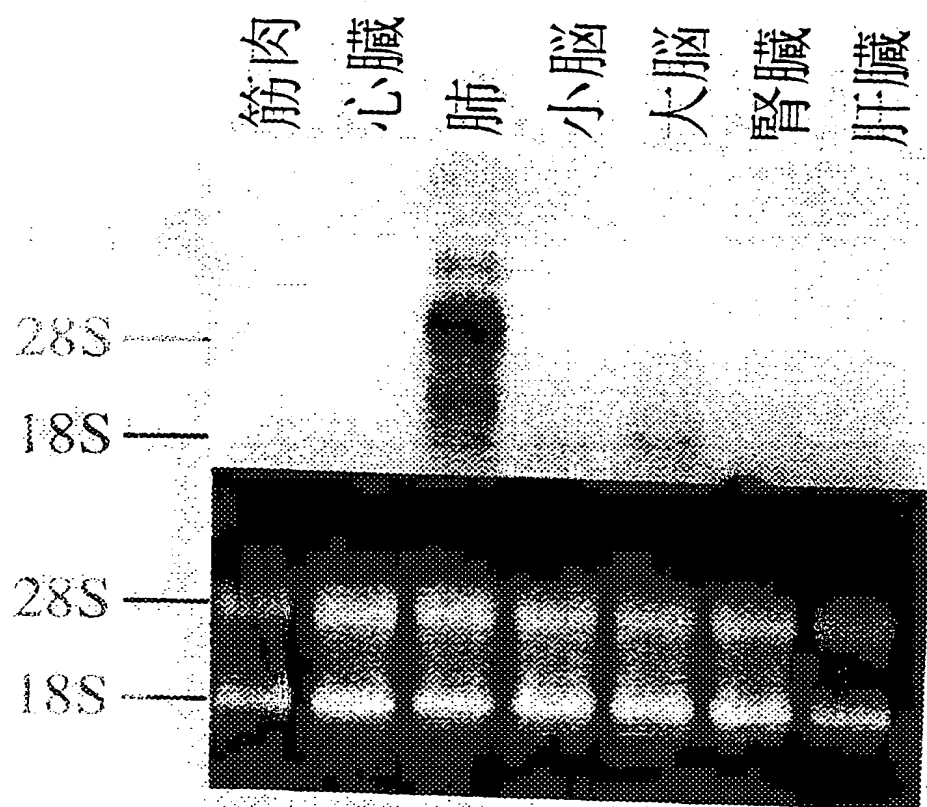
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)